(19)日本国特許庁(JP)

# 再公表特許(A1)

(11)国際公開番号
WO2003/033538

発行日 平成17年2月3日(2005.2.3)

(43)国際公開日 平成15年4月24日(2003.4.24)

| (51)Int.Cl.[7] | F I | |
|---|---|---|
| C12N 15/09 | C12N 15/00 | ZNAA |
| A01K 67/027 | A01K 67/027 | |
| A61K 39/395 | A61K 39/395 | N |
| A61P 35/00 | A61P 35/00 | |
| A61P 35/02 | A61P 35/02 | |

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 116 頁) 最終頁に続く

出願番号 特願2003-536276(P2003-536276)
(21)国際出願番号 PCT/JP2002/010665
(22)国際出願日 平成14年10月15日(2002.10.15)
(31)優先権主張番号 特願2001-317054(P2001-317054)
(32)優先日 平成13年10月15日(2001.10.15)
(33)優先権主張国 日本国(JP)
(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(71)出願人 000253503
麒麟麦酒株式会社
東京都中央区新川二丁目10番1号
(74)代理人 100091096
弁理士 平木 祐輔
(74)代理人 100118773
弁理士 藤田 節
(74)代理人 100096183
弁理士 石井 貞次
(72)発明者 俵 知紀
群馬県高崎市宮原町3番地 麒麟麦酒株式会社 医薬探索研究所内
(72)発明者 片岡 之郎
群馬県高崎市宮原町3番地 麒麟麦酒株式会社 医薬探索研究所内

(54)【発明の名称】抗ＨＬＡ－ＤＲ抗体

(57)【要約】
本発明は、抗ＨＬＡ－ＤＲモノクローナル抗体を提供する。本発明は（ａ）ＨＬＡ－ＤＲ発現癌細胞を担持した非ヒト動物において延命効果を示し、かつ（ｂ）Ｌ２４３と比べ免疫反応に対する抑制活性が弱い、からなる性質を有するＨＬＡ－ＤＲと結合する抗体又はその機能的断片、あるいは、マウス抗ＨＬＡ－ＤＲモノクローナル抗体Ｌ２４３（ＡＴＣＣ　ＨＢ－５５）と比べてＬ２４３と同等か又はＬ２４３より強い免疫抑制活性を示すＨＬＡ－ＤＲと結合する抗体又はその機能的断片である。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
ハイブリドーマＨＤ８（受託番号ＦＥＲＭ　ＢＰ－７７７３）が産生する、ＨＬＡ－ＤＲと結合する抗体又はその機能的断片。
【請求項２】
ハイブリドーマＨＤ８（受託番号ＦＥＲＭ　ＢＰ－７７７３）が産生する抗体の可変領域を有する、ＨＬＡ－ＤＲと結合する抗体又はその機能的断片。
【請求項３】
抗体のサブクラスが、ＩｇＧである請求項２記載の抗体又はその機能的断片。
【請求項４】
ＩｇＧがＩｇＧ１である請求項３記載の抗体又はその機能的断片。
【請求項５】
重鎖定常領域のアミノ酸配列を、改変した請求項４記載の抗体又はその機能的断片。
【請求項６】
重鎖定常領域のアミノ酸配列の改変が、ＥＵナンバリングシステムにおける３３１番目のアミノ酸のＳｅｒへの置換である請求項５記載の抗体又はその機能的断片。
【請求項７】
ＩｇＧがＩｇＧ２である請求項３記載の抗体又はその機能的断片。
【請求項８】
重鎖定常領域のアミノ酸配列を、改変した請求項７記載の抗体又はその機能的断片。
【請求項９】
重鎖定常領域のアミノ酸配列の改変が、ＥＵナンバリングシステムにおける３３１番目のアミノ酸のＳｅｒへの置換である請求項８記載の抗体又はその機能的断片。
【請求項１０】
ＩｇＧがＩｇＧ３である請求項３記載の抗体又はその機能的断片。
【請求項１１】
重鎖定常領域のアミノ酸配列を、改変した請求項１０記載の抗体又はその機能的断片。
【請求項１２】
ＩｇＧがＩｇＧ４である請求項３記載の抗体又はその機能的断片。
【請求項１３】
重鎖定常領域のアミノ酸配列を、改変した請求項１２記載の抗体又はその機能的断片。
【請求項１４】
ハイブリドーマＨＤ８（受託番号ＦＥＲＭ　ＢＰ－７７７３）。
【請求項１５】
ハイブリドーマＨＤ４（受託番号ＦＥＲＭ　ＢＰ－７７７１）が産生する、ＨＬＡ－ＤＲと結合する抗体又はその機能的断片。
【請求項１６】
ハイブリドーマＨＤ４（受託番号ＦＥＲＭ　ＢＰ－７７７１）が産生する抗体の可変領域を有する、ＨＬＡ－ＤＲと結合する抗体又はその機能的断片。
【請求項１７】
抗体のサブクラスが、ＩｇＧである請求項１６記載の抗体又はその機能的断片。
【請求項１８】
ＩｇＧがＩｇＧ１である請求項１７記載の抗体又はその機能的断片。
【請求項１９】
重鎖定常領域のアミノ酸配列を、改変した請求項１８記載の抗体又はその機能的断片。
【請求項２０】
ＩｇＧがＩｇＧ２である請求項１７記載の抗体又はその機能的断片。
【請求項２１】
重鎖定常領域のアミノ酸配列を、改変した請求項２０記載の抗体又はその機能的断片。
【請求項２２】

重鎖定常領域のアミノ酸配列の改変が、ＥＵナンバリングシステムにおける３３１番目のアミノ酸のＳｅｒへの置換である請求項２１記載の抗体又はその機能的断片。
【請求項２３】
ＩｇＧがＩｇＧ３である請求項１７記載の抗体又はその機能的断片。
【請求項２４】
重鎖定常領域のアミノ酸配列を、改変した請求項２３記載の抗体又はその機能的断片。
【請求項２５】
ＩｇＧがＩｇＧ４である請求項１７記載の抗体又はその機能的断片。
【請求項２６】
重鎖定常領域のアミノ酸配列を、改変した請求項２５記載の抗体又はその機能的断片。
【請求項２７】
ハイブリドーマＨＤ４（受託番号ＦＥＲＭ　ＢＰ－７７７１）。
【請求項２８】
ハイブリドーマＨＤ１０（受託番号ＦＥＲＭ　ＢＰ－７７７４）が産生する、ＨＬＡ－ＤＲと結合する抗体又はその機能的断片。
【請求項２９】
ハイブリドーマＨＤ１０（受託番号ＦＥＲＭ　ＢＰ－７７７４）。
【請求項３０】
ハイブリドーマＨＤ６（受託番号ＦＥＲＭ　ＢＰ－７７７２）が産生する、ＨＬＡ－ＤＲと結合する抗体又はその機能的断片。
【請求項３１】
ハイブリドーマＨＤ６（受託番号ＦＥＲＭ　ＢＰ－７７７２）が産生する抗体の可変領域を有する、ＨＬＡ－ＤＲと結合する抗体又はその機能的断片。
【請求項３２】
抗体のサブクラスが、ＩｇＧである請求項３１記載の抗体又はその機能的断片。
【請求項３３】
ＩｇＧがＩｇＧ１である請求項３２記載の抗体又はその機能的断片。
【請求項３４】
重鎖定常領域のアミノ酸配列を、改変した請求項３３記載の抗体又はその機能的断片。
【請求項３５】
ＩｇＧがＩｇＧ２である請求項３２記載の抗体又はその機能的断片。
【請求項３６】
重鎖定常領域のアミノ酸配列を、改変した請求項３５記載の抗体又はその機能的断片。
【請求項３７】
ＩｇＧがＩｇＧ３である請求項３２記載の抗体又はその機能的断片。
【請求項３８】
重鎖定常領域のアミノ酸配列を、改変した請求項３７記載の抗体又はその機能的断片。
【請求項３９】
ＩｇＧがＩｇＧ４である請求項３２記載の抗体又はその機能的断片。
【請求項４０】
重鎖定常領域のアミノ酸配列を、改変した請求項３９記載の抗体又はその機能的断片。
【請求項４１】
ハイブリドーマＨＤ６（受託番号ＦＥＲＭ　ＢＰ－７７７２）。
【請求項４２】
配列番号２１及び２３で示されるアミノ酸配列のうち可変領域の成熟体部分のアミノ酸配列を有する可変領域を含む、ＨＬＡ－ＤＲと結合する抗体又はその機能的断片。
【請求項４３】
配列番号２０及び２２で示される塩基配列がコードするペプチドのうち可変領域の成熟体部分からなる可変領域を含む、ＨＬＡ－ＤＲと結合する抗体又はその機能的断片。
【請求項４４】

抗体のサブクラスが、ＩｇＧである請求項４２記載の抗体又はその機能的断片。

【請求項４５】

ＩｇＧがＩｇＧ１である請求項４４記載の抗体又はその機能的断片。

【請求項４６】

重鎖定常領域のアミノ酸配列を、改変した請求項４５記載の抗体又はその機能的断片。

【請求項４７】

重鎖定常領域のアミノ酸配列の改変が、ＥＵナンバリングシステムにおける３３１番目のアミノ酸のＳｅｒへの置換である請求項４６記載の抗体又はその機能的断片。

【請求項４８】

サブクラスがＩｇＧ１でありＥＵナンバリングシステムにおける３３１番目のアミノ酸がＳｅｒへ置換された抗体ＨＤ８である抗体ＨＤ８Ｇ１Ｓｅｒ又はその機能的断片。

【請求項４９】

ＩｇＧがＩｇＧ２である請求項４４記載の抗体又はその機能的断片。

【請求項５０】

重鎖定常領域のアミノ酸配列を、改変した請求項４９記載の抗体又はその機能的断片。

【請求項５１】

重鎖定常領域のアミノ酸配列の改変が、ＥＵナンバリングシステムにおける３３１番目のアミノ酸がＳｅｒへ置換である請求項５０記載の抗体又はその機能的断片。

【請求項５２】

サブクラスがＩｇＧ２でありＥＵナンバリングシステムにおける３３１番目のアミノ酸がＳｅｒへ置換された抗体ＨＤ８である抗体ＨＤ８Ｇ２Ｓｅｒ又はその機能的断片。

【請求項５３】

ＩｇＧがＩｇＧ３である請求項４４記載の抗体又はその機能的断片。

【請求項５４】

重鎖定常領域のアミノ酸配列を、改変した請求項５３記載の抗体又はその機能的断片。

【請求項５５】

ＩｇＧがＩｇＧ４である請求項４４記載の抗体又はその機能的断片。

【請求項５６】

重鎖定常領域のアミノ酸配列を、改変した請求項５５記載の抗体又はその機能的断片。

【請求項５７】

配列番号１７及び１９で示されるアミノ酸配列のうち可変領域の成熟体部分のアミノ酸配列を有する可変領域を含む、ＨＬＡ－ＤＲと結合する抗体又はその機能的断片。

【請求項５８】

配列番号１６及び１８で示される塩基配列がコードするペプチドのうち可変領域の成熟体部分からなる可変領域を含む、ＨＬＡ－ＤＲと結合する抗体又はその機能的断片。

【請求項５９】

抗体のサブクラスが、ＩｇＧである請求項５７記載の抗体又はその機能的断片。

【請求項６０】

ＩｇＧがＩｇＧ１である請求項５９記載の抗体又はその機能的断片。

【請求項６１】

重鎖定常領域のアミノ酸配列を、改変した請求項６０記載の抗体又はその機能的断片。

【請求項６２】

ＩｇＧがＩｇＧ２である請求項５９記載の抗体又はその機能的断片。

【請求項６３】

重鎖定常領域のアミノ酸配列を、改変した請求項６２記載の抗体又はその機能的断片。

【請求項６４】

重鎖定常領域のアミノ酸配列の改変が、ＥＵナンバリングシステムにおける３３１番目のアミノ酸のＳｅｒへの置換である請求項６３記載の抗体又はその機能的断片。

【請求項６５】

サブクラスがＩｇＧ２でありＥＵナンバリングシステムにおける３３１番目のアミノ酸が

Ｓｅｒへ置換された抗体ＨＤ４である抗体ＨＤ４Ｇ２Ｓｅｒ又はその機能的断片。
【請求項６６】
ＩｇＧがＩｇＧ３である請求項５９記載の抗体又はその機能的断片。
【請求項６７】
重鎖定常領域のアミノ酸配列を、改変した請求項６６記載の抗体又はその機能的断片。
【請求項６８】
ＩｇＧがＩｇＧ４である請求項５９記載の抗体又はその機能的断片。
【請求項６９】
重鎖定常領域のアミノ酸配列を、改変した請求項６８記載の抗体又はその機能的断片。
【請求項７０】
ＨＬＡ－ＤＲのβ鎖（ＤＲＢ１＊１５０１１）の細胞外領域アミノ酸について１３－ｍｅｒペプチドを２アミノ酸ずつずらしてペプチドを作成し、該ペプチドをセルロース膜上にＣ末端から結合しＮ末端をアセチル化することからなるペプチドのうち、配列番号８２で示されるペプチドと最も強力に結合する、ＨＬＡ－ＤＲに結合する抗体又はその機能的断片。
【請求項７１】
ＨＬＡ－ＤＲのβ鎖（ＤＲＢ１＊１５０１１）の細胞外領域アミノ酸について１３－ｍｅｒペプチドを２アミノ酸ずつずらしてペプチドを作成し、該ペプチドをセルロース膜上にＣ末端から結合しＮ末端をアセチル化することからなるペプチドのうち、配列番号８２、８３及び８４で示される３種類のペプチド総てと強力に結合する、ＨＬＡ－ＤＲに結合する抗体又はその機能的断片。
【請求項７２】
ＨＬＡ－ＤＲのβ鎖（ＤＲＢ１＊１５０１１）の細胞外領域アミノ酸について１３－ｍｅｒペプチドを２アミノ酸ずつずらしてペプチドを作成し、該ペプチドをセルロース膜状にＣ末端から結合しＮ末端をアセチル化したことからなる配列番号２４から３９で示されるのすべてのペプチドと有意に結合し、かつ配列番号４０から４３で示されるすべてのペプチドと有意に結合する、ＨＬＡ－ＤＲに結合する抗体又はその機能的断片。
【請求項７３】
以下の性質（ａ）及び（ｂ）：
（ａ）６週齢のＳＣＩＤマウスに抗アシアロＧＭ１抗血清を１０μｌ／マウス個体で静脈内投与し、抗アシアロＧＭ１抗血清投与翌日にバーキットリンパ腫細胞Ｒａｊｉ（ＡＴＣＣ　ＣＣＬ－８６）を５×１０$^{6}$／マウス個体で静脈内投与し、Ｒａｊｉ投与５日後に投与量５μｇ／ｋｇ体重で１回投与した場合のマウスの投与９０日後の生存率が、ヒト抗ＨＳＡ抗体を同量投与した場合の生存率よりも高いという性質；及び
（ｂ）１０％ＦＣＳを含むＲＰＭＩ１６４０培地を用いて８ｍｇ／ｍＬに調製した抗体５０μＬと１０％ＦＣＳを含むＲＰＭＩ１６４０培地を用いて２×１０$^{5}$個／ｍＬに調製した第１のヒトドナー由来成熟樹状細胞浮遊液５０μＬとを９６穴プレートのウェル中で混合し、４℃で３０分間放置し、次いで１０％ＦＣＳを含むＲＰＭＩ１６４０培地を用いて１×１０$^{6}$個／ｍＬに調製した前記第１のヒトドナーと組織適合抗原が異なる第２のヒトドナー由来の純度９９％以上のＴ細胞浮遊液１００μＬを混合し、３７℃、５％$CO_2$存在下で５日間培養し、さらに$^{3}$Ｈチミジンを１．０μＣｉ／ウェルで添加して、さらに３７℃、５％$CO_2$存在下で１６～２０時間培養した後、細胞へ取り込まれた$^{3}$Ｈチミジンを回収し該$^{3}$Ｈチミジンをシンチレーターで測定し、$^{3}$Ｈチミジンの細胞への取り込みを指標として免疫抑制活性を測定した場合の免疫抑制活性が同濃度のマウス抗ＨＬＡ－ＤＲモノクローナル抗体Ｌ２４３（ＡＴＣＣ　ＨＢ－５５）を用いた場合の免疫抑制活性と比べて弱いという性質；
を有する、ＨＬＡ－ＤＲと結合する抗体又はその機能的断片。
【請求項７４】
抗体が、モノクローナル抗体である請求項７３記載の抗体又はその機能的断片。
【請求項７５】

抗体が、ヒト抗体である請求項７３記載の抗体又はその機能的断片。
【請求項７６】
マウス－マウスハイブリドーマにより産生される請求項７３記載の抗体又はその機能的断片。
【請求項７７】
１０％ＦＣＳを含むＲＰＭＩ１６４０培地を用いて８ｍｇ／ｍＬに調製した抗体５０μＬと１０％ＦＣＳを含むＲＰＭＩ１６４０培地を用いて$2\times10^{5}$個／ｍＬに調製した第１のヒトドナー由来成熟樹状細胞浮遊液５０μＬとを９６穴プレートのウェル中で混合し、４℃で３０分間放置し、次いで１０％ＦＣＳを含むＲＰＭＩ１６４０培地を用いて$1\times10^{6}$個／ｍＬに調製した前記第１のヒトドナーと組織適合抗原が異なる第２のヒトドナー由来の純度９９％以上のＴ細胞浮遊液１００μＬを混合し、３７℃、５％$CO_2$存在下で５日間培養し、さらに$^{3}$Ｈチミジンを１．０μＣｉ／ウェルで添加して、さらに３７℃、５％$CO_2$存在下で１６～２０時間培養した後、細胞へ取り込まれた$^{3}$Ｈチミジンを回収し該$^{3}$Ｈチミジンをシンチレーターで測定し、$^{3}$Ｈチミジンの細胞への取り込みを指標として免疫抑制活性を測定した場合の免疫抑制活性が同濃度のマウス抗ＨＬＡ－ＤＲモノクローナル抗体Ｌ２４３（ＡＴＣＣ　ＨＢ－５５）を用いた場合の免疫抑制活性と比べて同等又は強いという性質を有する、ＨＬＡ－ＤＲと結合する抗体又はその機能的断片。
【請求項７８】
抗体が、モノクローナル抗体である請求項７７記載の抗体又はその機能的断片。
【請求項７９】
抗体が、ヒト抗体である請求項７７記載の抗体又はその機能的断片。
【請求項８０】
マウス－マウスハイブリドーマにより産生される請求項７７記載の抗体又はその機能的断片。
【請求項８１】
ハイブリドーマＨＤ８（受託番号ＦＥＲＭ　ＢＰ－７７７３）、ハイブリドーマＨＤ１０（受託番号ＦＥＲＭ　ＢＰ－７７７４）、ハイブリドーマＨＤ４（受託番号ＦＥＲＭ　ＢＰ－７７７１）及びＨＤ６（受託番号ＦＥＲＭ　ＢＰ－７７７２）からなる群から選択されるハイブリドーマの保有する核酸であって、前記ハイブリドーマが産生する抗体の可変領域を含む抗体をコードする核酸又は該抗体の機能的断片をコードする核酸。
【請求項８２】
可変領域が配列番号１７および１９で示されるアミノ酸配列のうち可変領域の成熟体部分のアミノ酸配列を有する可変領域を含む、請求項８１記載の抗体をコードする核酸又は該抗体の機能的断片をコードする核酸。
【請求項８３】
可変領域が配列番号２１および２３で示されるアミノ酸配列のうち可変領域の成熟体部分のアミノ酸配列を有する可変領域を含む、請求項８１記載の抗体をコードする核酸又は該抗体の機能的断片をコードする核酸。
【請求項８４】
サブクラスがＩｇＧ１でありＥＵナンバリングシステムにおける３３１番目のアミノ酸がＳｅｒへ置換された抗体ＨＤ８である抗体ＨＤ８Ｇ１Ｓｅｒ、サブクラスがＩｇＧ２でありＥＵナンバリングシステムにおける３３１番目のアミノ酸がＳｅｒへ置換された抗体ＨＤ８である抗体ＨＤ８Ｇ２Ｓｅｒ及びサブクラスがＩｇＧ２でありＥＵナンバリングシステムにおける３３１番目のアミノ酸がＳｅｒへ置換された抗体ＨＤ４である抗体ＨＤ４Ｇ２Ｓｅｒからなる群から選択される抗体をコードする核酸又は該抗体の機能的断片をコードする核酸。
【請求項８５】
請求項８１～８４のいずれか１項に記載の核酸によりコードされるタンパク質。
【請求項８６】
請求項８１～８４のいずれか１項に記載の核酸を有する発現ベクター。

【請求項８７】
請求項８６に記載の発現ベクターを有する宿主。
【請求項８８】
大腸菌、酵母細胞、昆虫細胞、哺乳動物細胞及び植物細胞並びに哺乳動物からなる群から選ばれる請求項８７記載の宿主。
【請求項８９】
ハイブリドーマＨＤ８（受託番号ＦＥＲＭ　ＢＰ－７７７３）、ハイブリドーマＨＤ１０（受託番号ＦＥＲＭ　ＢＰ－７７７４）、ハイブリドーマＨＤ４（受託番号ＦＥＲＭ　ＢＰ－７７７１）及びＨＤ６（受託番号ＦＥＲＭ　ＢＰ－７７７２）からなる群から選択されるハイブリドーマから抗ＨＬＡ－ＤＲモノクローナル抗体をコードする遺伝子を単離し、該遺伝子を有する発現ベクターを構築し、該発現ベクターを宿主に導入して該モノクローナル抗体を発現せしめ、得られる宿主、宿主の培養上清又は宿主の分泌物から抗ＨＬＡ－ＤＲモノクローナル抗体を採取することを含む、抗ＨＬＡ－ＤＲモノクローナル抗体の製造方法。
【請求項９０】
請求項１～２６、２８及び４２～７６のいずれか１項に記載の抗体又はその機能的断片を有効成分として含有する、腫瘍の予防、治療又は診断剤。
【請求項９１】
腫瘍が、白血病（慢性リンパ性白血病、急性リンパ性白血病を含む）、リンパ腫（非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、Ｔ細胞系リンパ腫、Ｂ細胞系リンパ腫、バーキットリンパ腫、悪性リンパ腫、びまん性リンパ腫、濾胞性リンパ腫を含む）、骨髄腫（多発性骨髄腫を含む）、乳癌、大腸癌、腎臓癌、胃癌、卵巣癌、膵臓癌、子宮頚癌、子宮内膜癌、食道癌、肝臓癌、頭頚部扁平上皮癌、皮膚癌、尿路癌、前立腺癌、絨毛癌、咽頭癌、喉頭癌、きょう膜腫、男性胚腫、子宮内膜過形成、子宮内膜症、胚芽腫、線維肉腫、カポジ肉腫、血管腫、海綿状血管腫、血管芽腫、網膜芽腫、星状細胞腫、神経線維腫、稀突起謬腫、髄芽腫、神経芽腫、神経膠腫、横紋筋肉腫、謬芽腫、骨原性肉腫、平滑筋肉腫、甲状肉腫及びウィルムス腫瘍からなる群から選ばれる少なくとも１つである、請求項９０記載の腫瘍の予防、治療又は診断剤。
【請求項９２】
請求項３０～４０及び７７～８０のいずれか１項に記載の抗体又はその機能的断片を有効成分として含有する免疫抑制剤。
【請求項９３】
請求項３０～４０及び７７～８１のいずれか１項に記載の抗体又はその機能的断片を有効成分として含有する自己免疫疾患又はアレルギーの予防、治療又は診断剤。
【発明の詳細な説明】
技術分野
本発明は免疫に関与する細胞膜分子であるＨＬＡ－ＤＲ（ｈｕｍａｎ　ｌｅｕｃｏｃｙｔｅ　ａｎｔｉｇｅｎ－ＤＲ）を認識する抗ＨＬＡ－ＤＲ抗体に関する。さらに本発明は、抗ＨＬＡ－ＤＲ抗体を有効成分とする次の二項目の薬剤に関する：（１）ＨＬＡ－ＤＲを発現している細胞に起因する疾患に対する予防又は治療剤、特に悪性腫瘍治療剤、及び（２）ＨＬＡ－ＤＲを発現している細胞に起因する免疫反応に対する予防又は治療剤、特に慢性関節リウマチ治療剤。
背景技術
細胞表面に発現する蛋白質に結合し、細胞に対して細胞死あるいは傷害性を誘導する作用を有する抗体を癌などの治療に用いることが試みられている。現在、細胞膜上に存在するレセプターであるＣＤ２０を標的としたキメラ抗体（Ｒｉｔｕｘｉｍａｂ）、Ｈｅｒ２／ｎｅｕを標的としたヒト化抗体などのモノクローナル抗体が、悪性腫瘍を対象疾患として使用されており、その治療効果が認められている。抗体は、血中半減期が長く、抗原への特異性が高いという特徴を持ち、抗腫瘍剤として特に有用である。例えば、腫瘍特異的な抗原を標的とした抗体であれば、投与した抗体は腫瘍に集積することが推定されるので、

補体依存性細胞傷害活性（ＣＤＣ）や抗体依存的細胞性細胞傷害活性（ＡＤＣＣ）による、免疫システムの癌細胞に対する攻撃が期待できる。また、その抗体に放射性核種や細胞毒性物質などの薬剤を結合しておくことにより、結合した薬剤を効率よく腫瘍部位に送達することが可能となり、同時に、非特異的な他組織への該薬剤到達量が減少することで、副作用の軽減も見込むことができる。腫瘍特異的抗原に細胞死を誘導するような活性がある場合はアゴニスティックな活性を持つ抗体を投与することで、また、腫瘍特異的抗原が細胞の増殖及び生存に関与する場合は中和活性を持つ抗体を投与することで、腫瘍特異的な抗体の集積と、抗体の活性による腫瘍の増殖停止又は退縮が期待される。抗体は、上記のようにその特徴から抗腫瘍剤として適用するのに適切であると考えられる。

近年、Ｒｉｔｕｘｉｍａｂによって、Ｂ細胞リンパ腫において有意な抗腫瘍効果を発揮しており、副作用も限定されている。しかしながらＲｉｔｕｘｉｍａｂはヒトーマウスのキメラタンパクであることから、Ｒｉｔｕｘｉｍａｂそのものの抗原性が高く、体内でマウス部位に対する抗体が産生され、効果が減弱する可能性もある。また、Ｒｉｔｕｘｉｍａｂ単独では効果が低い癌もあり、抗がん剤との併用については現在臨床試験が行われている［ＭｃＬａｕｇｈｌｉｎ Ｐ．ｅｔ．ａｌ．，Ｊ Ｃｌｉｎ Ｏｎｃｏｌ．（１９９８），１６，２８２５－２８３３；Ｃｏｉｆｆｉｅｒ Ｂ．ｅｔ．ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ（１９９８），９２，１９２７－８１参照］。よって、新たな抗原をターゲットとした抗腫瘍抗体が必要とされており、クラスＩＩ主要組織適合遺伝子複合体（ＭＨＣ）分子の一種であるＨＬＡ－ＤＲに対するモノクローナル抗体には、Ｒｉｔｕｘｉｍａｂと異なる抗原を認識する抗体として臨床における抗腫瘍活性が期待される。

一方、クラスＩＩ主要組織適合遺伝子複合体（ＭＨＣ）分子は、抗原ペプチド断片に結合し、これらの抗原ペプチド断片をヘルパー（ＣＤ４$^{+}$）Ｔ細胞（「Ｔｈ」細胞）に提示する（Ｂａｂｂｉｎ Ｂ．ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ（１９８５），３１７，３５９－３６１参照）。クラスＩＩ ＭＨＣ分子に特異的なモノクローナル抗体は、インビトロにおいてＴｈ細胞の免疫応答の非常に強力な選択的阻害剤であることが報告されている［Ｂａｘｅｖａｎｉｓ CN，ｅｔ．ａｌ．，Ｉｍｍｕｎｏｇｅｎｅｔｉｃｓ（１９８０），１１，６１７－６２５参照］。このようなモノクローナル抗体は発見されて以来、慢性関節リウマチなどの自己免疫疾患の選択的免疫抑制治療に使用できる可能性のある薬物として考えられている。初期のインビボにおける研究により、これらモノクローナル抗体がＴｈ細胞性異種及び自己免疫応答に対して与える有用な影響が明らかにされた［Ｒｏｓｅｎｂａｕｍ JT．ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．（１９８１），１５４，１６９４－１７０２；Ｗａｌｄｏｒ MK．ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ（１９８３），８０，２７１３－２７１７；Ｊｏｎｋｅｒ Ｍ．ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ａｕｔｏｉｍｍｕｎ．（１９８８），１，３９９－４１４；Ｓｔｅｖｅｎｓ HP．ｅｔ．ａｌ．，Ｔｒａｎｓｐｌａｎｔ．Ｐｒｏｃ．（１９９０），２２，１７８３－１７８４参照］。さらに霊長類における研究により、同種移植における移植片対宿主反応を抑制することが明らかにされた［Ｂｉｌｌｉｎｇ Ｒ．＆ Ｃｈａｔｔｅｒｊｅｅ Ｓ．（１９８３），Ｔｒａｎｓｐｌａｎｔ．Ｐｒｏｃ．，１５，６４９－６５０；Ｊｏｎｋｅｒ Ｍ．ｅｔ．ａｌ．，Ｔｒａｎｓｐｌａｎｔ Ｐｒｏｃ．（１９９１），２３，２６４－２６５］。

現在臨床的には臓器移植時の拒絶反応の抑制には、シクロスポリンＡやＦＫ５０６といった免疫抑制剤が用いられているが、これらの免疫抑制剤の問題点は免疫反応を非特異的に抑制してしまうため強い副作用が起こる。

以上より、抗体はその特徴から副作用の少ない免疫抑制剤として適用するのに適切であると考えられる。

発明の開示

免疫抑制活性が高く、それ自身の免疫原性の低いヒト抗体を用いた免疫抑制剤の開発についても未解決である。

本発明は、このような抗体を作製し、抗腫瘍剤又は免疫抑制剤として使用することを目的とする。

本発明者らは、ヒトＨＬＡ－ＤＲに対する抗体の作製に関して鋭意研究した結果、ＨＬＡ－ＤＲを発現する癌細胞に非常に低濃度で抗腫瘍効果を示すモノクローナル抗体、及び、ＨＬＡ－ＤＲを介した免疫活性を特異的に抑制するモノクローナル抗体の取得に成功し、さらに該モノクローナル抗体の可変領域の配列を特定し、該モノクローナル抗体が結合するエピトープを決定し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は以下の通りである。

本発明は、その第１の態様において、及び及びマウスーマウスハイブリドーマにより産生されるＨＬＡ－ＤＲと結合するモノクローナル抗体、例えばＨＤ４、ＨＤ６、ＨＤ８又はＨＤ１０により産生される好ましくはヒト抗体であるモノクローナル抗体又はその機能的断片を提供する。ＨＤ４、ＨＤ６、ＨＤ８又はＨＤ１０により産生されるモノクローナル抗体のタイプはイムノグロブリンＧ（ＩｇＧ）型である。ここで、ハイブリドーマＨＤ８は、受託番号がＦＥＲＭ　ＢＰ－７７７３として、ハイブリドーマＨＤ１０は受託番号がＦＥＲＭ　ＢＰ－７７７４として、２００１年１０月１１日付けで独立行政法人　産業技術総合研究所　特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東１丁目１番地１　中央第６）に国際寄託されている。ハイブリドーマＨＤ４は受託番号がＦＥＲＭ　ＢＰ－７７７１として、２００１年１０月１１日付けで独立行政法人　産業技術総合研究所　特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東１丁目１番地１　中央第６）に国際寄託されている。ハイブリドーマＨＤ６は、受託番号がＦＥＲＭ　ＢＰ－７７７２として、２００１年１０月１１日付けで独立行政法人　産業技術総合研究所　特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東１丁目１番地１　中央第６）に国際寄託されている。

本発明の実施形態において、本発明の抗体は上記ハイブリドーマが産生する抗体の可変領域を有する、抗体又はその機能的断片である。

本発明の別の実施形態において、本発明の抗体はサブクラスが改変された抗体も含み、ハイブリドーマＨＤ８が産生する抗体であってサブクラスがＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３若しくはＩｇＧ４である抗体若しくはその機能的断片、ハイブリドーマＨＤ４が産生する抗体であってサブクラスがＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３若しくはＩｇＧ４である抗体若しくはその機能断片、ハイブリドーマＨＤ１０が産生する抗体であってサブクラスがＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３若しくはＩｇＧ４である抗体若しくはその機能的断片、又はハイブリドーマＨＤ６が産生する抗体であってサブクラスがＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３若しくはＩｇＧ４である抗体若しくはその機能的断片である。本発明のさらに別の実施形態において、本発明の抗体は重鎖定常領域のアミノ酸配列が改変された抗体又はその機能的断片であり、例えば重鎖定常域のＥＵナンバリングシステム（Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ ｉｎｔｅｒｅｓｔ，ＮＩＨ Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎ Ｎｏ．９１－３２４２を参照）における３３１番目のアミノ酸をＳｅｒに置き換えた抗体又はその機能的断片である。

本発明の別の実施形態において、抗体又はその機能的断片はＩｇＧ１、ＩｇＧ２、又はＩｇＧ４にサブクラスを組替えるか、さらに重鎖定常域のＥＵナンバリングシステムにおける３３１番目のアミノ酸をＳｅｒに置き換え、ＩｇＧ１、ＩｇＧ１Ｓｅｒ、ＩｇＧ２、ＩｇＧ２Ｓｅｒ又はＩｇＧ４に改変した結果、ＩｇＧ１及びＩｇＧ１ＳｅｒタイプのみがＡＤＣＣを発現し、ＩｇＧ１及びＩｇＧ２のみがＣＤＣ活性を発現する抗体又はその機能的断片である。

また、本発明の別の態様において、本発明はハイブリドーマＨＤ４、ＨＤ６、ＨＤ８又はＨＤ１０が産生する抗体の可変領域を含む、ＨＬＡ－ＤＲと結合する抗体又はその機能的断片を提供する。本発明の実施形態において、本発明の抗体は配列番号２１及び２３に示されるアミノ酸配列のうち可変領域の成熟体部分のアミノ酸配列を有する、ハイブリドーマＨＤ８が産生する抗体の可変領域を含む抗体又はその機能的断片である。本発明の別の実施形態において、本発明の抗体は配列番号１７及び１９に示されるアミノ酸配列のうち可変領域の成熟体部分のアミノ酸配列を有する、ハイブリドーマＨＤ４が産生する抗体の可変領域を含む抗体又はその機能的断片である。

さらに、本発明の別の態様において、本発明はＨＬＡ－ＤＲの特定のエピトープに結合し

得る抗体又はその機能的断片である。本発明の実施形態において、本発明の抗体は、ＨＬＡ－ＤＲのβ鎖（ＤＲＢ１＊１５０１１）の細胞外領域アミノ酸（配列番号１４７にアミノ酸配列、配列番号１４６に塩基配列を示す）について１３－ｍｅｒペプチドを２アミノ酸ずつずらしてペプチドを作成し（配列番号１４７のアミノ酸配列のうち第２９番目から第２２７番目の１９９アミノ酸について１３－ｍｅｒペプチドを作成する）、該ペプチドをセルロース膜上にＣ末端から結合しＮ末端をアセチル化することからなるペプチドのうち、配列番号８２で示されるペプチドと最も強力に結合する、ＨＬＡ－ＤＲに結合する抗体及びその機能的断片、ＨＬＡ－ＤＲのβ鎖（ＤＲＢ１＊１５０１１）の細胞外領域アミノ酸について１３－ｍｅｒペプチドを２アミノ酸ずつずらしてペプチドを作成し、該ペプチドをセルロース膜上にＣ末端から結合しＮ末端をアセチル化することからなるペプチドのうち、配列番号８２、８３及び８４で示される３種類のペプチド総てと強力に結合する、ＨＬＡ－ＤＲに結合する抗体及びその機能的断片、並びにＨＬＡ－ＤＲのβ鎖（ＤＲＢ１＊１５０１１）の細胞外領域アミノ酸について１３－ｍｅｒペプチドを２アミノ酸ずつずらしてペプチドを作成し、該ペプチドをセルロース膜状にＣ末端から結合しＮ末端をアセチル化したことからなる配列番号２４から３９で示されるのすべてのペプチドと有意に結合し、かつ配列番号４０から４３で示されるすべてのペプチドと有意に結合する、ＨＬＡ－ＤＲに結合する抗体又はその機能的断片である。

本発明はさらに、別の態様において、本発明の抗体又はその機能的断片は、腫瘍（例えばＳＣＩＤマウスに移植されたＲａｊｉ細胞に由来するもの）の増殖を抑制することでマウス個体の生存率を延長させることができる抗体又はその機能的断片を提供する。腫瘍を担持する被検動物（例えばリンパ腫細胞担癌マウスモデル等の担癌実験動物、体重２０ｇとする）に本発明の抗体又はその機能的断片を投与する量は、０．１μｇ／ｂｏｄｙ～１μｇ／ｂｏｄｙ又は５μｇ／ｋｇ～５０μｇ／ｋｇである。例えば、投与量として１μｇ／ｂｏｄｙ又は５０μｇ／ｋｇ、好ましくは０．１μｇ／ｂｏｄｙ又は５μｇ／ｋｇが挙げられる。

本発明の実施形態において、本発明の抗体は以下の性質（ａ）及び（ｂ）：

（ａ）６週齢のＳＣＩＤマウスに抗アシアロＧＭ１抗血清を１０μｌ／マウス個体で静脈内投与し、抗アシアロＧＭ１抗血清投与翌日にバーキットリンパ腫細胞Ｒａｊｉ（ＡＴＣＣ　ＣＣＬ－８６）を５×１０$^{6}$／マウス個体で静脈内投与し、Ｒａｊｉ投与５日後に投与量５０μｇ／ｋｇ体重から５μｇ／ｋｇ体重で投与した場合のマウスの生存率が、ヒト抗ＨＳＡ抗体を同量投与した場合の生存率よりも高いという性質；及び

（ｂ）１０％ＦＣＳを含むＲＰＭＩ１６４０培地を用いて８ｍｇ／ｍＬに調製した抗体５０μＬと１０％ＦＣＳを含むＲＰＭＩ１６４０培地を用いて２×１０$^{5}$個／ｍＬに調製した第１のヒトドナー由来成熟樹状細胞浮遊液５０μＬとを９６穴プレートのウェル中で混合し、４℃で３０分間放置し、次いで１０％ＦＣＳを含むＲＰＭＩ１６４０培地を用いて１×１０$^{6}$個／ｍＬに調製した前記第１のヒトドナーと組織適合抗原が異なる第２のヒトドナー由来の純度９９％以上のＴ細胞浮遊液１００μＬを混合し、３７℃、５％$CO_2$存在下で５日間培養し、さらに$^{3}$Ｈチミジンを１．０μＣｉ／ウェルで添加して、さらに３７℃、５％$CO_2$存在下で１６～２０時間培養した後、細胞へ取り込まれた$^{3}$Ｈチミジンを回収し該$^{3}$Ｈチミジンをシンチレーターで測定し、$^{3}$Ｈチミジンの細胞への取り込みを指標として免疫抑制活性を測定した場合の免疫抑制活性が同濃度のマウス抗ＨＬＡ－ＤＲモノクローナル抗体Ｌ２４３（ＡＴＣＣ　ＨＢ－５５）を用いた場合の免疫抑制活性と比べて弱いという性質；

を有する、ＨＬＡ－ＤＲと結合する抗体及びその機能的断片である。

本発明はさらに、別の態様において、マウス抗ＨＬＡ－ＤＲモノクローナル抗体Ｌ２４３（ＡＴＣＣ　ＨＢ－５５）と比べてＬ２４３と同等か又はＬ２４３より強い免疫抑制活性を示す、ＨＬＡ－ＤＲを認識する抗体又はその機能的断片を提供する。本発明の実施形態において、本発明の抗体は１０％ＦＣＳを含むＲＰＭＩ１６４０培地を用いて８ｍｇ／ｍＬに調製した抗体５０μＬと１０％ＦＣＳを含むＲＰＭＩ１６４０培地を用いて２×１０$^{5}$個／ｍＬに調製した第１のヒトドナー由来成熟樹状細胞浮遊液５０μＬとを９６穴プレ

ートのウェル中で混合し、４℃で３０分間放置し、次いで１０％ＦＣＳを含むＲＰＭＩ１６４０培地を用いて$1\times10^6$個／ｍＬに調製した前記第１のヒトドナーと組織適合抗原が異なる第２のヒトドナー由来の純度９９％以上のＴ細胞浮遊液１００μＬを混合し、３７℃、５％$CO_2$存在下で５日間培養し、さらに$^3$Ｈチミジンを１．０μＣｉ／ウェルで添加して、さらに３７℃、５％$CO_2$存在下で１６～２０時間培養した後、細胞へ取り込まれた$^3$Ｈチミジンを回収し該$^3$Ｈチミジンをシンチレーターで測定し、$^3$Ｈチミジンの細胞への取り込みを指標として免疫抑制活性を測定した場合の免疫抑制活性が同濃度のマウス抗ＨＬＡ－ＤＲモノクローナル抗体Ｌ２４３（ＡＴＣＣ　ＨＢ－５５）を用いた場合の免疫抑制活性と比べて同等又は強いという性質を有する、抗体又はその機能的断片を提供する。

本発明はさらに、別の態様において、ハイブリドーマＨＤ８（受託番号ＦＥＲＭ　ＢＰ－７７７３）、ハイブリドーマＨＤ１０（受託番号ＦＥＲＭ　ＢＰ－７７７４）、ハイブリドーマＨＤ４（受託番号ＦＥＲＭ　ＢＰ－７７７１）及びＨＤ６（受託番号ＦＥＲＭ　ＢＰ－７７７２）からなる群から選択されるハイブリドーマの保有する核酸であって、前記ハイブリドーマが産生する抗体の可変領域を含む抗体をコードする核酸又は該抗体の機能的断片をコードする核酸又は該抗体の機能的断片をコードする核酸、該核酸によりコードされるタンパク質、前記核酸を有する発現ベクター、該発現ベクターを有する大腸菌、酵母細胞、昆虫細胞、哺乳動物細胞及び植物細胞並びに哺乳動物からなる群から選ばれる宿主を提供する。本発明の実施形態において、本発明の抗体は、可変領域が配列番号１７および１９で示されるアミノ酸配列のうち可変領域の成熟体部分のアミノ酸配列を有する可変領域を含む前記抗体をコードする核酸又は該抗体の機能的断片をコードする核酸であり、可変領域が配列番号２１および２３で示されるアミノ酸配列のうち可変領域の成熟体部分のアミノ酸配列を有する可変領域を含む前記抗体をコードする核酸又は該抗体の機能的断片をコードする核酸であり、サブクラスがＩｇＧ１でありＥＵナンバリングシステムにおける３３１番目のアミノ酸がＳｅｒへ置換された抗体ＨＤ８である抗体ＨＤ８Ｇ１Ｓｅｒ、サブクラスがＩｇＧ２でありＥＵナンバリングシステムにおける３３１番目のアミノ酸がＳｅｒへ置換された抗体ＨＤ８である抗体ＨＤ８Ｇ２Ｓｅｒ及びサブクラスがＩｇＧ２でありＥＵナンバリングシステムにおける３３１番目のアミノ酸がＳｅｒへ置換された抗体ＨＤ４である抗体ＨＤ４Ｇ２Ｓｅｒからなる群から選択される抗体をコードする核酸又は該抗体の機能的断片をコードする核酸である。

本発明はさらに、別の態様において、ハイブリドーマＨＤ８（受託番号ＦＥＲＭ　ＢＰ－７７７３）、ハイブリドーマＨＤ１０（受託番号ＦＥＲＭ　ＢＰ－７７７４）、ハイブリドーマＨＤ４（受託番号ＦＥＲＭ　ＢＰ－７７７１）及びＨＤ６（受託番号ＦＥＲＭ　ＢＰ－７７７２）からなる群から選択されるハイブリドーマから抗ＨＬＡ－ＤＲモノクローナル抗体をコードする遺伝子を単離し、該遺伝子を有する発現ベクターを構築し、該発現ベクターを宿主に導入して該モノクローナル抗体を発現せしめ、得られる宿主、宿主の培養上清又は宿主の分泌物から抗ＨＬＡ－ＤＲモノクローナル抗体を採取することを含む、抗ＨＬＡ－ＤＲモノクローナル抗体の製造方法を提供する。

本発明はさらに、別の態様において、上記抗体又はその機能的断片を有効成分として含有する、腫瘍の予防、治療又は診断剤を提供する。

予防又は治療可能な腫瘍の例は、白血病（慢性リンパ性白血病、急性リンパ性白血病を含む）、リンパ腫（非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、Ｔ細胞系リンパ腫、Ｂ細胞系リンパ腫、バーキットリンパ腫、悪性リンパ腫、びまん性リンパ腫、濾胞性リンパ腫を含む）、骨髄腫（多発性骨髄腫を含む）、乳癌、大腸癌、腎臓癌、胃癌、卵巣癌、膵臓癌、子宮頸癌、子宮内膜癌、食道癌、肝臓癌、頭頸部扁平上皮癌、皮膚癌、尿路癌、前立腺癌、絨毛癌、咽頭癌、喉頭癌、きょう膜腫、男性胚腫、子宮内膜過形成、子宮内膜症、胚芽腫、線維肉腫、カポジ肉腫、血管腫、海綿状血管腫、血管芽腫、網膜芽腫、星状細胞腫、神経線維腫、稀突起謬腫、髄芽腫、神経芽腫、神経膠腫、横紋筋肉腫、謬芽腫、骨原性肉腫、平滑筋肉腫、甲状肉腫及びウィルムス腫瘍からなる群から選ばれる少なくとも１つである。

本発明はさらに、別の態様において、本発明の抗体又はその機能的断片を有効成分として含有する免疫抑制剤を提供し、さらに本発明の抗体又はその機能的断片を有効成分として含有する自己免疫疾患又はアレルギーの予防、治療又は診断剤を提供する。
本発明の実施形態において、予防又は治療剤は臓器移植時における免疫抑制剤（膵島移植や腎臓などの移植時における拒絶反応、ＧＶＨＤの予防又は治療剤）、あるいは自己免疫疾患（例えば、リウマチ、動脈硬化治療薬、多発性硬化症、全身性エリトマトーデス、特発性血小板減少症、クローン病など）治療剤、喘息などアレルギー治療剤の予防又は治療のためのものである。本発明のさらに別の実施形態において、本発明の抗体又はその機能的断片は、Ｒａｊｉ細胞が移植された担癌ＳＣＩＤマウスにおいて、腫瘍移植５日後に前記抗体又はその機能的断片の投与量５μｇ／ｋｇ以下で延命効果が認められることを特徴とする。
本発明は、さらに配列番号１７及び１９にそれぞれ示される、ハイブリドーマＨＤ４の産生する抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域、配列番号２１及び２３にそれぞれ示される、ハイブリドーマＨＤ８の産生する抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域の、マチュア部分のアミノ酸配列を有する抗体又はその機能的断片を含む。
上記抗体又はその機能的断片は、例えば、配列番号１６及び１８にそれぞれ示される、ハイブリドーマＨＤ４から単離された核酸配列にコードされる重鎖可変領域及び軽鎖可変領域、配列番号２０及び２２にそれぞれ示される、ハイブリドーマＨＤ８から単離された核酸配列にコードされる重鎖可変領域及び軽鎖可変領域の、マチュア部分のアミノ酸配列を有するものである。
以下、本発明を詳細に説明する。
抗ＨＬＡ－ＤＲモノクローナル抗体に、免疫反応に対して抑制活性があることも報告されている。初期のインビボにおける研究により、抗ＨＬＡ－ＤＲモノクローナル抗体がＴｈ細胞性異種及び自己免疫応答に対して与える有用な影響が明らかにされた［Ｒｏｓｅｎｂａｕｍ JT．ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．（１９８１），１５４，１６９４－１７０２；Ｗａｌｄｏｒ MK．ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ（１９８３），８０，２７１３－２７１７；Ｊｏｎｋｅｒ Ｍ．ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ａｕｔｏｉｍｍｕｎ．（１９８８），１，３９９－４１４；Ｓｔｅｖｅｎｓ HP．ｅｔ．ａｌ．，Ｔｒａｎｓｐｌａｎｔ．Ｐｒｏｃ．（１９９０），２２，１７８３－１７８４参照］。さらに霊長類における研究により、同種移植における移植片対宿主反応を抑制することが明らかにされた［Ｂｉｌｌｉｎｇ R．＆ Ｃｈａｔｔｅｒｊｅｅ Ｓ．（１９８３），Ｔｒａｎｓｐｌａｎｔ．Ｐｒｏｃ．，１５，６４９－６５０；Ｊｏｎｋｅｒ Ｍ．ｅｔ．ａｌ．，Ｔｒａｎｓｐｌａｎｔ Ｐｒｏｃ．（１９９１），２３，２６４－２６５］。しかしながら、これら報告されている抗体はマウス抗体である。最近になって、プロテインデザインラボラトリー社がｌＤ１０というマウス抗ＨＬＡ－ＤＲ抗体を用いて、彼らのもつヒト化技術により可変部位以外を遺伝子組換えによりヒト抗体の配列にしたヒト化ＨＬＡ－ＤＲ抗体が開発され［Ｓｈｅｒｉ AK．ｅｔ．ａｌ．，Ｉｎｔ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ（２００１），９３，５５６－５６５参照］、米国で臨床試験を実施している。
本発明の新規ヒト抗ＨＬＡ－ＤＲモノクローナル抗体は完全ヒト抗体であり、マウス抗体では常に問題となるマウスの配列に対する抗原性については、すでに回避されている。
該抗体としてはイムノグロブリンＧ（ＩｇＧ）、同Ａ（ＩｇＡ）、同Ｅ（ＩｇＥ）及び同Ｍ（ＩｇＭ）のいずれの型も好適に用いられうるが、通常はＩｇＧがより好適である。
以下、本発明で用いる語句の意味を明らかにすることにより、本発明を詳細に説明する。
１．ＨＬＡ－ＤＲ及びその抗体
本発明の抗体は、クラスＩＩの主要組織特異性複合体（ＭＨＣ）のひとつであるＨＬＡ－ＤＲに対する抗体、すなわちＨＬＡ－ＤＲを認識し結合する抗体、ＨＬＡ－ＤＲに反応性を有する抗体である。
本発明における「ＨＬＡ－ＤＲと結合する抗体」とは、ヒトＨＬＡ－ＤＲ又はその一部に反応性を有する抗体又は抗体の一部であり、これらの抗体の機能的断片も含む。「機能的

断片」とは、抗体の一部分（部分断片）であって、抗体の抗原への作用を１つ以上保持するものを意味し、具体的にはＦ（ａｂ’）$_2$、Ｆａｂ’、Ｆａｂ、Ｆｖ、ジスルフィド結合Ｆｖ、一本鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）、及びこれらの重合体等が挙げられる［Ｄ．Ｊ．Ｋｉｎｇ．，Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ　ａｎｄ　Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ　ｏｆ　Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ　Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ．，１９９８　Ｔ．Ｊ．Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ　Ｌｔｄ］。あるいは、「機能的断片」は、抗体の断片であって抗原と結合しうる断片である。本発明の抗体の機能的断片は、ＨＬＡ－ＤＲと結合し、抗腫瘍効果を示し、又は強い免疫抑制活性を示す。

本発明で「ヒト抗体」とは、ヒト由来の抗体遺伝子の発現産物である抗体を意味する。ヒト抗体は、後述のようにヒト抗体遺伝子座を導入し、ヒト由来抗体を産生する能力を有するトランスジェニック動物に抗原を投与することにより得ることができる。該トランスジェニック動物としてマウスが挙げられ、ヒト抗体を産生し得るマウスの作出方法は、国際公開ＷＯ０２／４３４７８号公報に記載されている。

本発明の抗体としては、例えば、後述の実施例に記載される、ヒトＨＬＡ－ＤＲの発現する癌細胞に低濃度で抗腫瘍効果を示す各種の抗体、を挙げることができる。

本発明の抗体には、抗体を構成する重鎖及び／又は軽鎖の各々のアミノ酸配列において、１又は数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有する重鎖及び／又は軽鎖からなるモノクローナル抗体も包含される。本発明の抗体のアミノ酸配列中に、前記のようなアミノ酸の部分的改変（欠失、置換、挿入、付加）は、そのアミノ酸配列をコードする塩基配列を部分的に改変することにより導入することができる。この塩基配列の部分的改変は、既知の部位特異的変異導入法（ｓｉｔｅ　ｓｐｅｃｉｆｉｃ　ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ）を用いて定法により導入することができる［Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　ＵＳＡ．，１９８４　Ｖｏｌ８１：５６６２］。ここで、抗体とは、イムノグロブリンを構成する重鎖可変領域及び重鎖定常領域、並びに軽鎖の可変領域及び軽鎖の定常領域を含む全ての領域が、イムノグロブリンをコードする遺伝子に由来するイムノグロブリンである。

本発明の抗体は、いずれのイムノグロブリンクラス及びアイソタイプを有する抗体をも包含する。

本発明の抗ＨＬＡ－ＤＲ抗体は、下記のような製造方法によって製造することができる。即ち、例えば、ヒトＨＬＡ－ＤＲ、その一部又はその一部と抗原の抗原性を高めるための適当なキャリア物質（例えば、牛血清アルブミン等）との結合物を、必要に応じて免疫賦活剤（フロインドの完全又は不完全アジュバント等）とともに、ヒト抗体産生トランスジェニックマウスなどの非ヒト哺乳動物に免疫する。あるいは、ヒトＨＬＡ－ＤＲα鎖及びβ鎖をコードする遺伝子を導入し、ＨＬＡ－ＤＲを細胞表面に過剰に発現している動物細胞を投与することにより、免疫感作を行うことができる。モノクローナル抗体は、免疫感作動物から得た抗体産生細胞と、自己抗体産生能のない骨髄腫系細胞（ミエローマ細胞）を融合することにより得られるハイブリドーマを培養し、免疫に用いた抗原に対して特異的親和性を示すモノクローナル抗体を産生するクローンを選択することによって取得することができる。

本発明の抗体は、当業者に周知である遺伝子工学的改変（例えば、欧州特許ＥＰ３１４１６１公報を参照のこと）により異なるサブクラスのものに変換されたものも包含する。すなわち、本発明の抗体の可変部をコードするＤＮＡを用いて遺伝子工学的手法を用いて元のサブクラスとは異なるサブクラスの抗体を得ることができる。例えば、本発明の抗体のサブクラスをＩｇＧ２又はＩｇＧ４に変換することにより、Ｆｃレセプターに対する結合度の低い抗体を取得することができる。逆に、本件発明の抗体のサブクラスをＩｇＧ１又はＩｇＧ３に変換することにより、Ｆｃレセプターに対する結合度の高い抗体を取得することができる。さらに、本発明の抗体の定常領域のアミノ酸配列を遺伝子工学的に改変すること、あるいはそのような配列を有する定常領域配列と結合することにより、Ｆｃレセプターに対する結合度を変化させること（Ｊａｎｅｗａｙ　ＣＡ．Ｊｒ．ａｎｄ　Ｔｒａｖｅｒｓ　Ｐ．（１９９７），Ｉｍｍｕｎｏｂｉｏｌｏｇｙ，Ｔｈｉｒｄ　Ｅｄｉｔｉｏ

n，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｂｉｏｌｏｇｙ Ｌｔｄ．／Ｇａｒｌａｎｄ Ｐｈｕｌｉｓｈｉｎｇ Ｉｎｃ．参照）、あるいは補体に対する結合度を変化させること（Ｍｉ－Ｈｕａ Ｔａｏ，ｅｔ ａｌ．１９９３．Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ参照）は可能であり、本発明の抗体は、これらの定常領域のアミノ酸配列を改変した抗体も包含する。ここで、アミノ酸配列の改変とはアミノ酸配列において１又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列をいう。例えば、重鎖定常部分のＥＵナンバリングシステム（Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ ｉｎｔｅｒｅｓｔ，ＮＩＨ Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎ Ｎｏ．９１－３２４２を参照）における３３１番目のプロリン（Ｐ）をコードする配列ＣＣＣをセリン（Ｓ）をコードするＴＣＣに変異させプロリンをセリンに置換することにより補体に対する結合度を変化させることができる。仮に抗癌剤について考えた場合、抗体単独で細胞死誘導活性がない場合は、Ｆｃレセプターを介した抗体依存性細胞障害活性（ＡＤＣＣ）や補体依存性細胞傷害活性（ＣＤＣ）による抗腫瘍活性を有する抗体が望ましいが、抗体単独で細胞死誘導活性がある場合はＦｃレセプターとの結合度が低い抗体がより望ましい場合もある。また免疫抑制剤について考えた場合、Ｔ細胞と抗原提示細胞の結合のみを立体的に阻害する場合などＡＤＣＣ活性或いはＣＤＣ活性を有さない抗体が望ましい。また、ＡＤＣＣ活性或いはＣＤＣ活性が毒性の原因となりうる場合、毒性の原因となる活性をＦｃ部分の変異あるいはサブクラスを変更することにより回避した抗体が望ましい場合もある。

本発明の抗体は、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、若しくはＩｇＧ４にサブクラスを組替えた改変抗体、又はさらにＩｇＧ１若しくはＩｇＧ２にサブクラスを組替えた改変抗体の重鎖定常域のＥＵナンバリングシステムにおける３３１番目のアミノ酸をＳｅｒに置き換えＩｇＧ１ＳｅｒもしくはＩｇＧ２Ｓｅｒとした改変抗体、すなわちＩｇＧ１、ＩｇＧ１Ｓｅｒ、ＩｇＧ２、ＩｇＧ２Ｓｅｒ又はＩｇＧ４に改変した結果、ＩｇＧ１及びＩｇＧ１ＳｅｒタイプのみがＡＤＣＣを発現し、ＩｇＧ１及びＩｇＧ２のみがＣＤＣ活性を発現する抗体をも含む。

また、本発明の抗体に、ヨード、イットリウム、インジウム、テクネチウム等の放射性核種［Ｊ．Ｗ．Ｇｏｄｉｎｇ，Ｍｏｍｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ ｐｒａｃｔｉｃｅ．，１９９３ Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ］、緑膿菌毒素、ジフテリアトキシン、リシンのような細菌毒素、及びメトトレキセート、マイトマイシン、カリキアマイシンなどの化学療法剤［Ｄ．Ｊ．Ｋｉｎｇ，Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ ａｎｄ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ ｏｆ Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ．，１９９８ Ｔ．Ｊ．Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ｌｔｄ．；Ｍ．Ｌ．Ｇｒｏｓｓｂａｒｄ．，Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｙ－ＢａｓｅｄＴｈｅｒａｐｙ ｏｆ Ｃａｎｃｅｒ．，１９９８ Ｍａｒｃｅｌ Ｄｅｋｋｅｒ Ｉｎｃ］、さらに、Ｍａｙｔａｎｓｉｎｏｉｄ等のプロドラッグ［Ｃｈａｒｉ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．，１９９２ Ｖｏｌ．５２：１２７；Ｌｉｕ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，１９９６ Ｖｏｌ．９３：８６８１］などを結合させることにより癌などの疾患の治療効果をさらに増強することも可能である。

本発明において、モノクローナル抗体の製造にあたっては、下記の作業工程を包含する。すなわち、（１）免疫原として使用する、生体高分子の精製及び／又は抗原タンパク質を細胞表面に過剰に発現している細胞の作製、（２）抗原を動物に注射することにより免疫した後、血液を採取しその抗体価を検定して脾臓等の摘出の時期を決定してから、抗体産生細胞を調製する工程、（３）骨髄腫細胞（ミエローマ）の調製、（４）抗体産生細胞とミエローマとの細胞融合、（５）目的とする抗体を産生するハイブリドーマ群の選別、（６）単一細胞クローンへの分割（クローニング）、（７）場合によっては、モノクローナル抗体を大量に製造するためのハイブリドーマの培養、又はハイブリドーマを移植した動物の飼育、（８）このようにして製造されたモノクローナル抗体の生理活性及びその認識特異性の検討、あるいは標識試薬としての特性の検定、等である。

以下、抗ＨＬＡ－ＤＲモノクローナル抗体の作製法を上記工程に沿って詳述するが、該抗体の作製法はこれに制限されず、例えば脾細胞以外の抗体産生細胞及びミエローマを使用

することもできる。
（１）抗原の精製
抗原としては、ＨＬＡ－ＤＲα鎖及びβ鎖をコードするＤＮＡを動物細胞用発現ベクターに組み込み、該発現ベクターを動物細胞に導入し、取得した形質転換株そのものを使用できる。因みに、ＨＬＡ－ＤＲα鎖及びβ鎖の一次構造は公知である［Ｓｔｅｖｅｎ ＧＥ，ｅｔ ａｌ．，（２０００）Ｔｈｅ ＨＬＡ ＦａｃｔｓＢｏｏｋ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ発行参照］ので、当業者に周知の方法により、ＨＬＡ－ＤＲのアミノ酸配列からペプチドを化学合成し、これを抗原として使用することもできる。
また、免疫原としては、ヒトＨＬＡ－ＤＲのα鎖及びβ鎖全長をＬ９２９細胞に導入し、細胞表面にＨＬＡ－ＤＲヘテロダイマーを過剰に発現している細胞も有効である。ｐＥＦ－ｎｅｏ－ＨＬＡ－ＤＲα及びｐＥＦ－ｎｅｏ－ＨＬＡ－ＤＲβは、それぞれ、ヒトＨＬＡ－ＤＲα鎖タンパク質をコードするＤＮＡ及びヒトＨＬＡ－ＤＲβ鎖タンパク質をコードするＤＮＡを、動物細胞用発現ベクターｐＥＦ－ｎｅｏに組み込むことにより作製できる。ｐＥＦ－ｎｅｏは改変ｐＥＦ－ＢＯＳ［Ｍｉｚｕｓｈｉｍａ Ｓ．＆ Ｎａｇａｔａ Ｓ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ（１９９０），１８，５３３２参照］にｎｅｏｍｙｃｉｎ耐性遺伝子を組み込んだベクターである。ただし、ＨＬＡ－ＤＲをコードするＤＮＡ、ベクター、宿主等はこれらに限定されない。。
具体的には、ｐＥＦ－ｎｅｏ－ＨＬＡ－ＤＲα及びｐＥＦ－ｎｅｏ－ＨＬＡ－ＤＲβでＬ９２９細胞を形質転換して得られた形質転換株を培養し、ｐＥＦ－ｎｅｏベクターが挿入された細胞に獲得されるネオマイシン耐性の形質及びヤギ抗ＨＬＡ－ＤＲポリクローナル抗体（ＤＡＫＯ社製）を用いたＨＬＡ－ＤＲ発現の確認とを指標に、ヒトＨＬＡ－ＤＲをその細胞表面に過剰に発現しているＬ９２９細胞を作製することができる。
（２）抗体産生細胞の調製工程
（１）で得られた抗原と、フロインドの完全若しくは不完全アジュバント、又はカリミョウバンのような助剤とを混合し、免疫原として実験動物に免疫する。実験動物としては、ヒト由来の抗体を産生する能力を有するトランスジェニックマウスが最も好適に用いられるが、そのようなマウスは富塚らの文献［Ｔｏｍｉｚｕｋａ．ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ．，２０００ Ｖｏｌ ９７：７２２］に記載されている。
マウス免疫の際の免疫原投与法は、皮下注射、腹腔内注射、静脈内注射、皮内注射、筋肉内注射、足蹠注射などいずれでもよいが、腹腔内注射、足蹠注射又は静脈内注射が好ましい。
免疫は、一回、又は、適当な間隔で（好ましくは２週間から４週間間隔で）複数回繰返し行うことができる。その後、免疫した動物の血清中の抗原に対する抗体価を測定し、抗体価が十分高くなった動物を抗体産生細胞の供給原として用いれば、以後の操作の効果を高めることができる。一般的には、最終免疫後３～５日後の動物由来の抗体産生細胞を、後の細胞融合に用いることが好ましい。
ここで用いられる抗体価の測定法としては、放射性同位元素免疫定量法（以下「ＲＩＡ法」という）、固相酵素免疫定量法（以下「ＥＬＩＳＡ法」という）、蛍光抗体法、受身血球凝集反応法など種々の公知技術があげられるが、検出感度、迅速性、正確性、及び操作の自動化の可能性などの観点から、ＲＩＡ法又はＥＬＩＳＡ法がより好適である。
本発明における抗体価の測定は、例えばＥＬＩＳＡ法によれば、以下に記載するような手順により行うことができる。まず、ヒト抗体に対する抗体をＥＬＩＳＡ用９６穴プレート等の固相表面に吸着させ、さらに抗原が吸着していない固相表面を抗原と無関係なタンパク質、例えばウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）により覆い、該表面を洗浄後、一次抗体として段階希釈した試料（例えばマウス血清）に接触させ、上記抗原に試料中の抗ＨＬＡ－ＤＲ抗体を結合させせる。さらに二次抗体として酵素標識されたヒト抗体に対する抗体を加えてヒト抗体に結合させ、洗浄後該酵素の基質を加え、基質分解に基づく発色による吸光度の変化等を測定することにより、抗体価を算出する。
（３）ミエローマの調製工程

ミエローマとしては、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギ又はヒト等の哺乳動物に由来する自己抗体産生能のない細胞を用いることが出来るが、一般的にはマウスから得られた株化細胞、例えば８－アザグアニン耐性マウス（ＢＡＬＢ／ｃ由来）ミエローマ株Ｐ３Ｘ６３Ａｇ８Ｕ．１（Ｐ３－Ｕ１）［Ｙｅｌｔｏｎ，Ｄ．Ｅ．ｅｔ　ａｌ．Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｔｏｐｉｃｓ　ｉｎ　Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ　ａｎｄ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，８１，１－７（１９７８）］、Ｐ３／ＮＳＩ／１－Ａｇ４－１（ＮＳ－１）［Ｋｏｈｌｅｒ，Ｇ．ｅｔ　ａｌ．Ｅｕｒｏｐｅａｎ　Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，６，５１１－５１９（１９７６）］、Ｓｐ２／０－Ａｇ１４（ＳＰ－２）［Ｓｈｕｌｍａｎ，Ｍ．ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ，２７６，２６９－２７０（１９７８）］、Ｐ３Ｘ６３Ａｇ８．６５３（６５３）［Ｋｅａｒｎｅｙ，Ｊ．Ｆ．ｅｔ　ａｌ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，１２３，１５４８－１５５０（１９７９）］、Ｐ３Ｘ６３Ａｇ８（Ｘ６３）［Ｈｏｒｉｂａｔａ，Ｋ．ａｎｄ　Ｈａｒｒｉｓ，Ａ．Ｗ．Ｎａｔｕｒｅ，２５６，４９５－４９７（１９７５）］などを用いることが好ましい。これらの細胞株は、適当な培地、例えば８－アザグアニン培地［グルタミン、２－メルカプトエタノール、ゲンタマイシン及びウシ胎児血清（以下「ＦＣＳ」という）を加えたＲＰＭＩ－１６４０培地に８－アザグアニンを加えた培地］、イスコフ改変ダルベッコ培地（Ｉｓｃｏｖｅ’ｓ　Ｍｏｄｉｆｉｅｄ　Ｄｕｌｂｅｃｃｏ’ｓ　Ｍｅｄｉｕｍ；以下「ＩＭＤＭ」という）、又はダルベッコ改変イーグル培地（Ｄｕｌｂｅｃｃｏ’ｓ　Ｍｏｄｉｆｉｅｄ　Ｅａｇｌｅ　Ｍｅｄｉｕｍ；以下「ＤＭＥＭ」という）で継代培養するが、細胞融合の３～４日前に正常培地（例えば、１０％ＦＣＳを含むＤＭＥＭ培地）で継代培養し、融合当日に$２×１０^{7}$以上の細胞数を確保しておく。

（４）細胞融合

抗体産生細胞は、形質細胞、及びその前駆細胞であるリンパ球であり、これは個体のいずれの部位から得てもよく、一般には脾、リンパ節、骨髄、扁桃、末梢血、又はこれらを適宜組み合わせたもの等から得ることができるが、脾細胞が最も一般的に用いられる。

最終免疫後、所定の抗体価が得られたマウスから抗体産生細胞が存在する部位、例えば脾臓を摘出し、抗体産生細胞である脾細胞を調製する。この脾細胞と工程（３）で得られたミエローマを融合させる手段として現在最も一般的に行われているのは、細胞毒性が比較的少なく融合操作も簡単な、ポリエチレングリコールを用いる方法である。この方法は、例えば以下の手順よりなる。

脾細胞とミエローマとを無血清培地（例えばＤＭＥＭ）、又はリン酸緩衝生理食塩液（以下「ＰＢＳ」という）でよく洗浄し、脾細胞とミエローマの細胞数の比が５：１～１０：１程度になるように混合し、遠心分離する。上清を除去し、沈澱した細胞群をよくほぐした後、撹拌しながら１ｍＬの５０％（ｗ／ｖ）ポリエチレングリコール（分子量１０００～４０００）を含む無血清培地を滴下する。その後、１０ｍＬの無血清培地をゆっくりと加えた後遠心分離する。再び上清を捨て、沈澱した細胞を適量のヒポキサンチン・アミノプテリン・チミジン（以下「ＨＡＴ」という）液及びヒトインターロイキン－６（以下「ＩＬ－６」という）を含む正常培地（以下「ＨＡＴ培地」という）中に懸濁して培養用プレート（以下「プレート」という）の各ウェルに分注し、５％炭酸ガス存在下、３７℃で２週間程度培養する。途中適宜ＨＡＴ培地を補う。

（５）ハイブリドーマ群の選択

上記ミエローマ細胞が、８－アザグアニン耐性株である場合、すなわち、ヒポキサンチン・グアニン・ホスホリボシルトランスフェラーゼ（ＨＧＰＲＴ）欠損株である場合、融合しなかった該ミエローマ細胞、及びミエローマ細胞どうしの融合細胞は、ＨＡＴ含有培地中では生存できない。一方、抗体産生細胞どうしの融合細胞、あるいは、抗体産生細胞とミエローマ細胞とのハイブリドーマは生存することができるが、抗体産生細胞どうしの融合細胞には寿命がある。従って、ＨＡＴ含有培地中での培養を続けることによって、抗体産生細胞とミエローマ細胞とのハイブリドーマのみが生き残り、結果的にハイブリドーマを選択することができる。

コロニー状に生育してきたハイブリドーマについて、ＨＡＴ培地からアミノプテリンを除

いた培地（以下「ＨＴ培地」という）への培地交換を行う。以後、培養上清の一部を採取し、例えば、ＥＬＩＳＡ法により抗ＨＬＡ－ＤＲ抗体価を測定する。ただし、ＥＬＩＳＡ用の抗原として上記融合タンパク質を用いる場合は、ヒトＩｇＧのＦｃ領域に特異的に結合する抗体を産生するクローンを選択しないように、該クローンを除外する操作が必要である。そのようなクローンの有無は、例えばヒトＩｇＧのＦｃ領域を抗原としたＥＬＩＳＡ等により確認することができる。

以上、８－アザグアニン耐性の細胞株を用いる方法を例示したが、その他の細胞株もハイブリドーマの選択方法に応じて使用することができ、その場合使用する培地組成も変化する。

（６）クローニング工程

（２）の記載と同様の方法で抗体価を測定することにより、特異的抗体を産生することが判明したハイブリドーマを、別のプレートに移しクローニングを行う。このクローニング法としては、プレートの１ウェルに１個のハイブリドーマが含まれるように希釈して培養する限界希釈法、軟寒天培地中で培養しコロニーを回収する軟寒天法、マイクロマニュピレーターによって１個づつの細胞を取り出し培養する方法、セルソーターによって１個の細胞を分離する「ソータクローン」などが挙げられるが、限界希釈法が簡便であり、よく用いられる。

抗体価の認められたウェルについて、例えば限界希釈法によるクローニングを２～４回繰返し、安定して抗体価の認められたものを抗ＨＬＡ－ＤＲモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ株として選択する。

なお、本発明のヒト抗ＨＬＡ－ＤＲモノクローナル抗体の産生細胞であるマウス－マウスハイブリドーマＨＤ８、ＨＤ１０、ＨＤ４及びＨＤ６は、２００１年１０月１１日付けで独立行政法人産業技術総合研究所（茨城県つくば市東１丁目１番地１　中央第６）に国際寄託されている。ハイブリドーマＨＤ８は受託番号がＦＥＲＭ　ＢＰ－７７７３として、ハイブリドーマＨＤ１０は受託番号がＦＥＲＭ　ＢＰ－７７７４として、ハイブリドーマＨＤ４は受託番号がＦＥＲＭ　ＢＰ－７７７１として、ハイブリドーマＨＤ６は受託番号がＦＥＲＭ　ＢＰ－７７７２である。

（７）ハイブリドーマ培養によるモノクローナル抗体の調製

クローニングを完了したハイブリドーマは、培地をＨＴ培地から正常培地に換えて培養される。大量培養は、大型培養瓶を用いた回転培養、スピナー培養、あるいはホローファイバーシステムを用いた培養で行われる。この大量培養における上清を、ゲルろ過等、当業者に周知の方法を用いて精製することにより、本発明の予防又は治療剤を有効成分として含有する抗ＨＬＡ－ＤＲモノクローナル抗体を得ることができる。また、同系統のマウス（例えばＢＡＬＢ／ｃ）若しくはｎｕ／ｎｕマウス、ラット、モルモット、ハムスター又はウサギ等の腹腔内で該ハイブリドーマを増殖させることにより、本発明の予防又は治療剤を有効成分として含有する抗ＨＬＡ－ＤＲモノクローナル抗体を大量に含む腹水を得ることができる。精製の簡便な方法としては、市販のモノクローナル抗体精製キット（例えば、ＭＡｂＴｒａｐ　ＧＩＩキット；アマシャムファルマシアバイオテク社製）等を利用することもできる。

かくして得られるモノクローナル抗体は、ヒトＨＬＡ－ＤＲに対して高い抗原特異性を有する。

（８）モノクローナル抗体の検定

かくして得られたモノクローナル抗体のアイソタイプ及びサブクラスの決定は以下のように行うことができる。まず、同定法としてはオクテルロニー（Ｏｕｃｈｔｅｒｌｏｎｙ）法、ＥＬＩＳＡ法、又はＲＩＡ法が挙げられる。オクテルロニー法は簡便ではあるが、モノクローナル抗体の濃度が低い場合には濃縮操作が必要である。一方、ＥＬＩＳＡ法又はＲＩＡ法を用いた場合は、培養上清をそのまま抗原吸着固相と反応させ、さらに二次抗体として各種イムノグロブリンアイソタイプ、サブクラスに対応する抗体を用いることにより、モノクローナル抗体のアイソタイプ、サブクラスを同定することが可能である。

さらに、タンパク質の定量は、フォーリンロウリー法、及び２８０ｎｍにおける吸光度［

１．４．（ＯＤ２８０）＝イムノグロブリン１ｍｇ／ｍＬ］より算出する方法により行うことができる。
モノクローナル抗体の認識エピトープの同定は以下のようにして行うことができる。まず、モノクローナル抗体の認識する分子の様々な部分構造を作製する。部分構造の作製にあたっては、公知のオリゴペプチド合成技術を用いてその分子の様々な部分ペプチドを作成する方法、遺伝子組換え技術を用いて目的の部分ペプチドをコードするＤＮＡ配列を好適な発現プラスミドに組み込み、大腸菌等の宿主内外で生産する方法等があるが、上記目的のためには両者を組み合わせて用いるのが一般的である。例えば、抗原タンパク質のＣ末端又はＮ末端から適当な長さで順次短くした一連のポリペプチドを当業者に周知の遺伝子組換え技術を用いて作製した後、それらに対するモノクローナル抗体の反応性を検討し、大まかな認識部位を決定する。
その後、さらに細かく、その対応部分のオリゴペプチド、又は該ペプチドの変異体等を、当業者に周知のオリゴペプチド合成技術を用いて種々合成し、本発明の予防又は治療剤が有効成分として含有するモノクローナル抗体のそれらペプチドに対する結合性を調べるか、又は該モノクローナル抗体と抗原との結合に対するペプチドの競合阻害活性を調べることによりエピトープを限定する。多種のオリゴペプチドを得るための簡便な方法として、市販のキット（例えば、ＳＰＯＴｓキット（ジェノシス・バイオテクノロジーズ社製）、マルチピン合成法を用いた一連のマルチピン・ペプチド合成キット（カイロン社製）等）を利用することもできる。
又はイブリドーマ等の抗体産生細胞からヒトモノクローナル抗体をコードする遺伝子をクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主（例えば哺乳類細胞細胞株、大腸菌、酵母細胞、昆虫細胞、植物細胞など）に導入し、遺伝子組換え技術を用いて産生させた組換え型抗体を調製することもできる（Ｐ．Ｊ．Ｄｅｌｖｅｓ．，ＡＮＴＩＢＯＤＹ　ＰＲＯＤＵＣＴＩＯＮ　ＥＳＳＥＮＴＩＡＬ　ＴＥＣＨＮＩＱＵＥＳ．，１９９７　ＷＩＬＥＹ、Ｐ．Ｓｈｅｐｈｅｒｄ　ａｎｄ　Ｃ．Ｄｅａｎ．，Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ　Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ．，２０００　ＯＸＦＯＲＤ　ＵＮＩＶＥＲＳＩＴＹ　ＰＲＥＳＳ．Ｊ．Ｗ．Ｇｏｄｉｎｇ．，Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ　Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ　ａｎｄ　ｐｒａｃｔｉｃｅ．，１９９３　ＡＣＡＤＥＭＩＣ　ＰＲＥＳＳ）。
本発明は、本発明の抗体を産生するハイブリドーマが保有する抗体の遺伝子配列を含む核酸、特に後述の本発明のハイブリドーマの産生する抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域のマチュア部分に対応する核酸も包含する。ここで、核酸にはＤＮＡ及びＲＮＡが含まれる。また、本発明は本発明の抗体を産生するハイブリドーマが保有する抗体の遺伝子配列を含む核酸において、重鎖あるいは軽鎖の可変領域の部分のフレーム部分（ＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３及びＦＲ４：Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ　ｏｆ　ｐｒｏｔｅｉｎｓ　ｏｆ　ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ　ｉｎｔｅｒｅｓｔ，ＮＩＨ　Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎ　Ｎｏ．９１－３２４２を参照）の塩基の１個以上の塩基が置換、欠失および／または付加により配列が改変され、配列が改変される前の核酸に相補的な核酸とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、ＨＬＡ－ＤＲと結合し、（ａ）ＨＬＡ－ＤＲ発現癌細胞を担持した非ヒト動物において延命効果を示し、かつ（ｂ）Ｌ２４３と比べ免疫反応に対する抑制活性が弱い、からなる性質を有するか、あるいは、マウス抗ＨＬＡ－ＤＲモノクローナル抗体Ｌ２４３（ＡＴＣＣ　ＨＢ－５５）と比べてＬ２４３と同等か又はＬ２４３より強い免疫抑制活性を示す抗体をコードする核酸も包含する。ここで、抗体とは、イムノグロブリンを構成する重鎖可変領域及び重鎖定常領域、並びに軽鎖の可変領域及び軽鎖の定常領域を含む全ての領域が、イムノグロブリンをコードする遺伝子に由来するイムノグロブリンである。また、ストリンジェントな条件とは、本発明の抗体をコードするＤＮＡ配列と９０％以上の相同性、好ましくは９５％以上の相同性、より好ましくは９７％以上の相同性が配列間に存在するときのみハイブリダイゼーションが起こることを意味する。通常、完全ハイブリッドの融解温度より約５℃～約３０℃、好ましくは約１０℃～約２５℃低い温度でハイブリダイゼーションが起こる場合をいう。ストリンジェントな条件については、Ｊ．Ｓａｍｂｒｏｏｋら、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ，Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ

Ｍａｎｎｕａｌ，Ｓｅｃｏｎｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ（１９８９）に記載されており、ここに記載の条件を使用し得る。

ハイブリドーマからモノクローナル抗体をコードする遺伝子を調製するには、モノクローナル抗体のＬ鎖Ｖ領域、Ｌ鎖Ｃ領域、Ｈ鎖Ｖ領域及びＨ鎖Ｃ領域をそれぞれコードするＤＮＡをＰＣＲ法等により調製する方法が採用される。プライマーは、抗ＨＬＡ－ＤＲ抗体遺伝子又はアミノ酸配列から設計したオリゴＤＮＡを、鋳型としてはハイブリドーマから調製したＤＮＡを使用することができる。これらのＤＮＡを１つの適当なベクターに組み込み、これを宿主に導入して発現させるか、あるいはこれらのＤＮＡをそれぞれ適当なベクターに組み込み、共発現させる。

ベクターには、宿主微生物で自律的に増殖し得るファージ又はプラスミドが使用される。プラスミドＤＮＡとしては、大腸菌、枯草菌又は酵母由来のプラスミドなどが挙げられ、ファージＤＮＡとしてはλファージが挙げられる。

形質転換に使用する宿主としては、目的の遺伝子を発現できるものであれば特に限定されるものではない。例えば、細菌（大腸菌、枯草菌等）、酵母、動物細胞（ＣＯＳ細胞、ＣＨＯ細胞等）、昆虫細胞が挙げられる。

宿主への遺伝子の導入方法は公知であり、任意の方法（例えばカルシウムイオンを用いる方法、エレクトロポレーション法、スフェロプラスト法、酢酸リチウム法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法等）が挙げられる。また、後述の動物に遺伝子を導入する方法としては、マイクロインジェクション法、ＥＳ細胞にエレクトロポレーションやリポフェクション法を使用して遺伝子を導入する方法、核移植法などが挙げられる。

本発明において、抗ＨＬＡ－ＤＲ抗体は、形質転換体を培養し、その培養物から採取することにより得ることができる。「培養物」とは、（ａ）培養上清、（ｂ）培養細胞若しくは培養菌体又はその破砕物、（ｃ）形質転換体の分泌物のいずれをも意味するものである。形質転換体を培養するには、使用する宿主に適した培地を用い、静置培養法、ローラーボトルによる培養法などが採用される。

培養後、目的タンパク質が菌体内又は細胞内に生産される場合には、菌体又は細胞を破砕することにより抗体を採取する。また、目的抗体が菌体外又は細胞外に生産される場合には、培養液をそのまま使用するか、遠心分離等により菌体又は細胞を除去する。その後、タンパク質の単離精製に用いられる各種クロマトグラフィーを用いた一般的な生化学的方法を単独で又は適宜組み合わせて用いることにより、前記培養物中から目的の抗体を単離精製することができる。

さらに、トランスジェニック動物作製技術を用いて、目的抗体の遺伝子が内在性遺伝子に組み込まれた動物宿主、例えばトランスジェニックウシ、トランスジェニックヤギ、トランスジェニックヒツジ又はトランスジェニックブタを作製し、そのトランスジェニック動物から分泌されるミルク中からその抗体遺伝子に由来するモノクローナル抗体を大量に取得することも可能である（Ｗｒｉｇｈｔ，Ｇ．，ｅｔ ａｌ．（１９９１）Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ９，８３０－８３４）。ハイブリドーマをインビトロで培養する場合には、培養する細胞種の特性、試験研究の目的及び培養方法等の種々条件に合わせて、ハイブリドーマを増殖、維持及び保存させ、培養上清中にモノクローナル抗体を産生させるために用いられるような既知栄養培地、あるいは既知の基本培地から誘導調製されるあらゆる栄養培地を用いて実施することが可能である。

（９）抗体の性質

本発明の抗体は下記のａ）及びｂ）の機能的特性を有するもので、それぞれの特性は例えば各項目に記載の方法により確認することができる：

ａ）　ＳＣＩＤマウス等の免疫不全マウスにＨＬＡ－ＤＲを発現しているヒト癌細胞を移植し、本発明の抗体を投与したときのマウス生存率を調べた結果、マウスの生存日数が延長する。

ｂ）　同種異系リンパ球混合による免疫反応への抑制活性がＬ２４３と比べて弱い。

また、ａ）及びｂ）の特性は詳細には、

（ａ）６週齢のＳＣＩＤマウスに抗アシアロＧＭ１抗血清を１０μｌ／マウス個体で静脈内投与し、抗アシアロＧＭ１抗血清投与翌日にバーキットリンパ腫細胞Ｒａｊｉ（ＡＴＣＣ　ＣＣＬ－８６）を５×１０$^{6}$／マウス個体で静脈内投与し、Ｒａｊｉ投与５日後に投与量５～５０μｇ／ｋｇ体重、好ましくは５μｇ／ｋｇ体重で１回投与した場合のマウスの生存率が、ヒト抗ＨＳＡ抗体を同量投与した場合の９０日後の生存率よりも高いという性質；及び

（ｂ）１０％ＦＣＳを含むＲＰＭＩ１６４０培地を用いて８～２００ｍｇ／ｍＬ、好ましくは８ｍｇ／ｍＬに調製した抗体５０μＬと１０％ＦＣＳを含むＲＰＭＩ１６４０培地を用いて２×１０$^{5}$個／ｍＬに調製した第１のヒトドナー由来成熟樹状細胞浮遊液５０μＬとを９６穴プレートのウェル中で混合し４℃で３０分間放置し、次いで１０％ＦＣＳを含むＲＰＭＩ１６４０培地を用いて１×１０$^{6}$個／ｍＬに調製した前記第１のヒトドナーと組織適合抗原が異なる第２のヒトドナー由来の純度９９％以上のＴ細胞浮遊液１００μＬを混合し、３７℃、５％$CO_2$存在下で５日間培養し、さらに$^{3}$Ｈチミジンを１．０μＣｉ／ウェルで添加して、さらに３７℃、５％$CO_2$存在下で１６～２０時間培養した後、細胞へ取り込まれた$^{3}$Ｈチミジンを回収し該$^{3}$Ｈチミジンをシンチレーターで測定し、$^{3}$Ｈチミジンの細胞への取り込みを指標として免疫抑制活性を測定した場合の免疫抑制活性が同濃度のマウス抗ＨＬＡ－ＤＲモノクローナル抗体Ｌ２４３（ＡＴＣＣ　ＨＢ－５５）を用いた場合の免疫抑制活性と比べて弱いという性質である。

このような抗体として、例えばハイブリドーマＨＤ４（受託番号ＦＥＲＭ　ＢＰ－７７７１）の産生する抗体、ハイブリドーマＨＤ８（受託番号ＦＥＲＭ　ＢＰ－７７７３）の産生する抗体及びハイブリドーマＨＤ１０（受託番号ＦＥＲＭ　ＢＰ－７７７４）の産生する抗体が挙げられる。

前記ａ）の性質は前記抗体が強い抗腫瘍活性を有することを意味する。

さらに、本発明の抗体は、同種異系リンパ球混合による免疫反応への抑制活性がＬ２４３と同等又はそれ以上の免疫抑制活性を有する、という機能的特性を有するもである。この特性は詳細には、１０％ＦＣＳを含むＲＰＭＩ１６４０培地を用いて８～２００ｍｇ／ｍＬ、好ましくは８ｍｇ／ｍＬに調製した抗体５０μＬと１０％ＦＣＳを含むＲＰＭＩ１６４０培地を用いて２×１０$^{5}$個／ｍＬに調製した第１のヒトドナー由来成熟樹状細胞浮遊液５０μＬとを９６穴プレートのウェル中で混合し４℃で３０分間放置し、次いで１０％ＦＣＳを含むＲＰＭＩ１６４０培地を用いて１×１０$^{6}$個／ｍＬに調製した前記第１のヒトドナーと組織適合抗原が異なる第２のヒトドナー由来の純度９９％以上のＴ細胞浮遊液１００μＬを混合し、３７℃、５％$CO_2$存在下で５日間培養し、さらに$^{3}$Ｈチミジンを１．０μＣｉ／ウェルで添加して、さらに３７℃、５％$CO_2$存在下で１６～２０時間培養した後、細胞へ取り込まれた$^{3}$Ｈチミジンを回収し該$^{3}$Ｈチミジンをシンチレーターで測定し、$^{3}$Ｈチミジンの細胞への取り込みを指標として免疫抑制活性を測定した場合の免疫抑制活性が同濃度のマウス抗ＨＬＡ－ＤＲモノクローナル抗体Ｌ２４３（ＡＴＣＣ　ＨＢ－５５）を用いた場合の免疫抑制活性と比べて同等又は強いという特性である。このような抗体として、例えばハイブリドーマＨＤ６（受託番号ＦＥＲＭ　ＢＰ－７７７２）の産生する抗体が挙げられる。

本発明の上記の活性を有する抗体は、悪性腫瘍に対する予防又は治療剤に含有させるための成分或いは免疫抑制剤に含有させるための成分として有用である。

本発明の抗体は、驚くべきことに、０．１μｇ／マウス個体（５μｇ／ｋｇ体重）という低用量でマウス担癌モデルにおける腫瘍細胞増殖による生存率の低下を顕著に抑制し、マウスモデルにおいて延命効果を示す。本発明の抗体と同時にコントロールとしてヒト抗ヒト血清アルブミン（ＨＳＡ）抗体を投与した場合に本発明の抗体を投与したマウスの生存率がコントロールマウスの生存率に比べ有意に向上した場合、延命効果を示すと判断できる。例えば、本発明の抗体及び抗ＨＳＡ抗体をリンパ腫細胞を移植したマウス担癌モデル５匹ずつに投与した場合に、抗ＨＳＡ抗体投与マウス群が死に絶えた時点で、本発明抗体を投与したマウスが少なくとも１匹生存していれば、マウス担癌モデルにおいて延命効果を示すといえる。

免疫抑制効果は、上述のように同種異系リンパ球混合（ＭＬＲ）による免疫反応への抑制活性をみることにより評価でき、ＭＬＲは公知の方法で行うことができる。
また、本発明の抗体が認識するＨＬＡ－ＤＲのエピトープは公知の方法により決定することができる。例えば、ＨＬＡ－ＤＲのβ鎖（ＤＲＢ１＊１５０１１）の細胞外領域１９９アミノ酸（配列番号１４７に示すアミノ酸配列のうち第２９番目から第２２７番目の１９９アミノ酸、配列番号１４６には配列番号１４７に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す）について、１３－ｍｅｒペプチドを１アミノ酸ずつずらしてペプチドを作成し（例えば、配列番号５２から１４５に示されるアミノ酸配列を有するペプチド）、反応性をみた場合、本発明の抗体は配列番号８２に示されるアミノ酸配列を有するペプチドともっとも強力に結合し、又は配列番号８２、８３及び８４で示される３種類のペプチドの少なくとも一つと強力に結合する抗体である。ここで、「強力に結合」するとは、実施例１７（２）で示される方法においてバックグラウンドに比して１０倍以上の蛍光強度を示す結合のことである。本発明の抗体はＨＬＡ－ＤＲのβ鎖の６１番目から７１番目のペプチドに反応性を有する。さらに、ＨＬＡ－ＤＲには約３５０種類の多型があることが知られている（ＥＭＢＬ－ＥＢＩのＩＭＧＴ／ＨＬＡデータベースなど参照）。本発明の抗体はこれらの多型の実質的にほぼすべてを認識し得る。ここで、多型の実質的にほぼ全てを認識し得ることは、約３５０種類の多型のほぼ全部を含むペプチド群を作製し、このペプチド群のほぼすべてと反応するかどうかを測定することにより決定することができる。例えば、配列番号２４から３９に示す１６種類のペプチドの１２種類以上と反応した場合、その抗体はＨＬＡ－ＤＲの実質的にほぼすべての多型を認識する抗体である。本発明の抗体は配列番号２４から３９で示されるすべてのペプチドと有意に結合し、かつ配列番号４０から４３で示されるすべてのペプチドと有意に結合する。ここで、「有意に結合」するとは、実施例１７（３）で示される方法においてバックグラウンドに比して１０％以上の蛍光強度を示す結合のことである。
２．医薬組成物
本発明のヒト抗ＨＬＡ－ＤＲ抗体の精製された製剤を含有する製剤もまた、本発明の範囲内に含まれる。このような製剤は、好ましくは、抗体に加えて、生理学的に許容され得る希釈剤又はキャリアを含んでおり、他の抗体又は抗生物質のような他の薬剤との混合物であってもよい。適切なキャリアには、生理的食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水グルコース液、及び緩衝生理食塩水が含まれるが、これらに限定されるものではない。或いは、抗体は凍結乾燥（フリーズドライ）し、必要とされるときに上記のような緩衝水溶液を添加することにより再構成して使用してもよい。かかる予防又は治療剤は、種々の形態で投与することができ、それらの投与形態としては、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、シロップ剤等による経口投与、又は、注射剤、点滴剤、坐薬等による非経口投与を挙げることができる。
その投与量は、症状、年齢、体重などによって異なるが、通常、経口投与では、成人に対して、１日約０．０１ｍｇ乃至１０００ｍｇであり、これらを１回、又は数回に分けて投与することができる。また、非経口投与では、１回約０．０１ｍｇ乃至１０００ｍｇを皮下注射、筋肉注射又は静脈注射によって投与することができる。
本発明の抗体又は医薬組成物は、ＨＬＡ－ＤＲを発現している細胞に起因する可能性を有する種々の疾患又は症状の治療又は予防への適用が可能である。その疾患又は症状としては、各種悪性腫瘍、臓器移植時における免疫抑制剤（膵島移植や腎臓などの移植時における拒絶反応、ＧＶＨＤの予防又は治療剤）として、あるいは自己免疫疾患（例えば、リウマチ、動脈硬化治療薬、多発性硬化症、全身性エリトマトーデス、特発性血小板減少症、クローン病など）治療剤、喘息などアレルギー治療剤が挙げられる。
例えば、下記のａ）及びｂ）の機能的特性を有する本発明の抗体及び該抗体を含む医薬組成物は、各種悪性腫瘍の予防又は治療に用い得る。
ａ）　ＳＣＩＤマウス等の免疫不全マウスにＨＬＡ－ＤＲを発現しているヒト癌細胞を移植し、本発明の抗体を投与したときのマウス生存率を調べた結果、マウスの生存日数が延長する。

ｂ）　同種異系リンパ球混合による免疫反応への抑制活性がＬ２４３と比べて弱い。
また、同種異系リンパ球混合による免疫反応への抑制活性がＬ２４３と同等又はそれ以上の免疫抑制活性を有する本発明の抗体及び該抗体を含む医薬組成物は、リウマチ、移植片対宿主疾患（ＧｖＨＤ）の予防又は治療に用い得る。
本発明は、本発明の抗体又は医薬組成物を用いた上記疾患の予防又は治療法をも包含し、さらに本発明は本発明の抗体の上記疾患の予防又は治療剤の製造への使用をも包含する。
腫瘍の種類は、白血病（慢性リンパ性白血病、急性リンパ性白血病を含む）、リンパ腫（非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、Ｔ細胞系リンパ腫、Ｂ細胞系リンパ腫、バーキットリンパ腫、悪性リンパ腫、びまん性リンパ腫、濾胞性リンパ腫を含む）、骨髄腫（多発性骨髄腫を含む）、乳癌、大腸癌、腎臓癌、胃癌、卵巣癌、膵臓癌、子宮頚癌、子宮内膜癌、食道癌、肝臓癌、頭頚部扁平上皮癌、皮膚癌、尿路癌、前立腺癌、絨毛癌、咽頭癌、喉頭癌、きょう膜腫、男性胚腫、子宮内膜過形成、子宮内膜症、胚芽腫、線維肉腫、カポジ肉腫、血管腫、海綿状血管腫、血管芽腫、網膜芽腫、星状細胞腫、神経線維腫、稀突起謬腫、髄芽腫、神経芽腫、神経膠腫、横紋筋肉腫、謬芽腫、骨原性肉腫、平滑筋肉腫、甲状肉腫及びウィルムス腫瘍であり、本発明の抗体を適用する際の腫瘍は１種類に限られず、複数種類の腫瘍が併発したものでもよい。
３．製剤例
本発明の分子は、水又はそれ以外の薬理学的に許容し得る溶液に溶解した無菌性溶液又は懸濁液のアンプルとして使用に供される。また、無菌粉末製剤（本発明の分子を凍結乾燥するのが好ましい）をアンプルに充填しておき、使用時に薬理学的に許容し得る溶液で希釈してもよい。
配列表フリーテキスト
配列番号１～１５－人工配列の説明：プライマー
配列番号２４～１４５－人工配列の説明：ペプチド
発明を実施するための最良の形態
以下、実施例を以て本発明をさらに詳細に説明するが、本発明がその実施例に記載される態様のみに限定されるものではない。
実施例１　抗原の調製
ヒトＨＬＡ－ＤＲが細胞膜上に過剰発現している細胞を得るため、ヒトＨＬＡ－ＤＲα鎖及びβ鎖全長アミノ酸の発現プラスミドベクターを作製した。ＨＬＡ－ＤＲα鎖及びβ鎖をコードするＤＮＡは、ＰＣＲ法により作製した。
ａ）全長ヒトＨＬＡ－ＤＲα鎖及びβ鎖発現ベクターの調製
鋳型ＰＣＲを行うにあたり、鋳型として用いたのは、ヒトＨＬＡ－ＤＲα鎖及びβ鎖をコードするｃＤＮＡを保持するプラスミドベクターｐＥＦ－ｎｅｏ－ＨＬＡ－ＤＲα及びｐＥＦ－ｎｅｏ－ＨＬＡ－ＤＲβである。ｐＥＦ－ｎｅｏ－ＨＬＡ－ＤＲα及びｐＥＦ－ｎｅｏ－ＨＬＡ－ＤＲβは以下の方法で作製された。完全長ヒトＨＬＡ－ＤＲα鎖ＤＮＡ及びＨＬＡ－ＤＲβ鎖ＤＮＡを、その５’末端にＥｃｏＲＩ配列を、その３’末端にＮｏｔＩ配列と終止コドンを付加する為のポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）を行い修飾した。ヒト末梢血単核球由来ｃＤＮＡを鋳型として、ＨＬＡ－ＤＲαについてはプライマーとして：５’－ＣＣＧＧＡＡＴＴＣＣＣＡＣＣＡＴＧＧＣＣＡＴＡＡＧＴＧＧＡＧＴＣＣＣＴＧＴＧ－３’（配列番号１）及び５’－ＡＡＡＧＣＧＧＣＣＧＣＴＣＡＴＴＡＣＡＧＡＧＧＣＣＣＣＣＴＧＣＧＴＴＣＴＧＣ－３’（配列番号２）を、ＨＬＡ－ＤＲβについてはプライマーとして：５’－ＣＣＧＧＡＡＴＴＣＣＴＧＧＴＣＣＴＧＴＣＣＴＧＴＴＣＴＣＣＡＧＣＡ－３’（配列番号３）及び５’－ＡＡＡＧＣＧＧＣＣＧＣＴＣＡＴＣＡＧＣＴＣＡＧＧＡＡＴＣＣＴＧＴＴＧＧＣＴＧ－３’（配列番号４）を合成し、ＬＡ－ＴａｑＤＮＡポリメラーゼ（ギブコ・ビーアールエル社製）を使用して、（９４℃、１５秒；５５℃、３０秒；７２℃、６０秒間）×３０サイクルのＰＣＲ反応を行った。合成された配列を、ＥｃｏＲＩ－ＮｏｔＩ断片として単離し、同一酵素で解裂されていたｐＥＦ－ｎｅｏベクター（改変ｐＥＦ－ＢＯＳ［Ｍｉｚｕｓｈｉｍａ　Ｓ．＆　Ｎａｇａｔａ　Ｓ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ（１９９０），１８，５３３２参照］にｎｅｏｍｙｃｉ

ｎ耐性遺伝子を組み込んだベクター）に連結した。得られたプラスミドをｐＥＦ－ｎｅｏ－ＨＬＡ－ＤＲα及びｐＥＦ－ｎｅｏ－ＨＬＡ－ＤＲβと命名した。ｐＥＦ－ｎｅｏ－ＨＬＡ－ＤＲαに組み込まれたＨＬＡ－ＤＲαは、７６５ｂｐのｃＤＮＡがコードされ、ｐＥＦ－ｎｅｏ－ＨＬＡ－ＤＲβに組み込まれたＨＬＡ－ＤＲβは、８０１ｂｐのｃＤＮＡがコードされている。以下、実施例中のすべてのＰＣＲの反応温度調節は、ジーンアンプＰＣＲシステム９７００；（株）パーキンエルマー・ジャパン社製を使用した。

ｃ）ヒトＨＬＡ－ＤＲ発現細胞の作製

ｂ）で作製したｐＥＦ－ｎｅｏ－ＨＬＡ－ＤＲα及びｐＥＦ－ｎｅｏ－ＨＬＡ－ＤＲβを、ＬｉｐｏｆｅｃｔＡＭＩＮＥＰｌｕｓ（ギブコ・ビーアールエル社製）を用いて、Ｌ９２９細胞（Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｙｐｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（ＡＴＣＣ）Ｎｏ．ＣＣＬ－１）に導入した。遺伝子導入はマニュアルの方法にて行った。細胞培養用フラスコ（培養面積７５ｃｍ$^2$）中で３７℃、５．０％炭酸ガス下で２４時間培養した後、Ｇ４１８（ギブコ・ビーアールエル社製）を１ｍｇ／ｍＬになるように加え、１週間培養した。次いで、Ｒ－ｐｈｙｃｏｅｒｙｔｈｒｉｎ標識したマウス抗ヒトＨＬＡ－ＤＲ抗体（ＢＤファーミンジェン社製）を用いたフローサイトメーター（ＦＣＭ：ベクトンディキンソン社製）解析を行い、遺伝子導入された細胞でＧ４１８耐性の形質を獲得したもののうち、細胞膜表面上にＨＬＡ－ＤＲを発現している細胞を選択的にソーティングした。

ＰＣＲ用プライマー等のオリゴヌクレオチドの合成は、全てＤＮＡ自動合成機（モデル３９４８；（株）パーキンエルマー・ジャパン・アプライドバイオシステムズ事業部製）を用いて、そのマニュアルに従って行った［Ｍａｔｔｅｕｃｃｉ，Ｍ．Ｄ．ａｎｄ　Ｃａｒｕｔｈｅｒｓ，Ｍ．Ｈ．（１９８１）Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．１０３，３１８５－３１９１参照］。各オリゴヌクレオチドは合成終了後、支持体から開裂させ脱保護を行い、得られた溶液を乾固した後蒸留水に溶解し、使用するまで－２０℃で凍結保存した。

実施例２　ヒト抗体産生マウスの作製

免疫に用いたマウスは、内因性Ｉｇ重鎖及びκ軽鎖破壊の両者についてホモ接合体の遺伝的背景を有しており、かつ、ヒトＩｇ重鎖遺伝子座を含む１４番染色体断片（ＳＣ２０）及びヒトＩｇκ鎖トランスジーン（ＫＣｏ５）を同時に保持する。このマウスはヒトＩｇ重鎖遺伝子座を持つ系統Ａのマウスと、ヒトＩｇκ鎖トランスジーンを持つ系統Ｂのマウスとの交配により作製された。系統Ａは、内因性Ｉｇ重鎖及びκ軽鎖破壊の両者についてホモ接合体であり、子孫伝達可能な１４番染色体断片（ＳＣ２０）を保持するマウス系統であり、例えば富塚らの報告［Ｔｏｍｉｚｕｋａ．ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　ＵＳＡ．，２０００　Ｖｏｌ９７：７２２］に記載されている。また、系統Ｂは内因性Ｉｇ重鎖及びκ軽鎖破壊の両者についてホモ接合体であり、ヒトＩｇκ鎖トランスジーン（ＫＣｏ５）を保持するマウス系統（トランスジェニックマウス）であり、例えばＦｉｓｈｗｉｌｄｓらの報告［Ｎａｔ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ，（１９９６），１１４：８４５］に記載されている。

系統Ａの雄マウスと系統Ｂの雌マウス、あるいは系統Ａの雌マウスと系統Ｂの雄マウスの交配により得られた、血清中にヒトＩｇ重鎖及びκ軽鎖が同時に検出される個体［Ｉｓｈｉｄａ　＆　Ｌｏｎｂｅｒｇ，ＩＢＣ’ｓ　１１ｔｈ　Ａｎｔｉｂｏｄｙ　Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ，Ａｂｓｔｒａｃｔ　２０００］を、以下の免疫実験に用いた。なお、前記ヒト抗体産生マウス（ＫＭマウスと称する）は、契約を結ぶことによって、キリンビール株式会社より入手可能である。

実施例３　ヒトＨＬＡ－ＤＲに対するヒトモノクローナル抗体の調製

本実施例におけるモノクローナル抗体の作製は、単クローン抗体実験操作入門（安東民衛ら著作、講談社発行　１９９１）等に記載されるような一般的方法に従って調製した。免疫原としてのヒトＨＬＡ－ＤＲは、実施例１で調製したＨＬＡ－ＤＲ発現Ｌ９２９細胞を用いた。被免疫動物は、実施例２で作製したヒト免疫グロブリンを産生するヒト抗体産生マウスを用いた。

ヒトＨＬＡ－ＤＲに対するヒトモノクローナル抗体の調製を目的として、ヒト抗体産生マ

ウスに、実施例１で作製したＨＬＡ－ＤＲ発現Ｌ９２９細胞（５×１０$^{6}$細胞／匹）を腹腔内に初回免疫した。初回免疫から以降、同細胞を２、４、８週間後に免疫した。以下に述べる脾臓及びリンパ節の取得３日前に、１×１０$^{6}$細胞／マウス個体の細胞を尾静脈投与及び５ｎｇ／マウス個体のＲｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ　Ｈｕｍａｎ　ＩＬ－６（以下、ＩＬ－６、キリンビール社医薬探索研究所にて調製）を皮下投与した。

免疫されたマウスから脾臓及び／又はリンパ節を外科的に取得し、３５０ｍｇ／ｍＬ炭酸水素ナトリウム、５０単位／ｍＬペニシリン、５０μｇ／ｍＬストレプトマイシンを含む無血清ＤＭＥＭ培地（ギブコ・ビーアールエル社製）（以下「無血清ＤＭＥＭ培地」という）１０ｍＬ中に入れ、メッシュ（セルストレイナー：ファルコン社製）上でスパーテルを用いてつぶした。メッシュを通過した細胞懸濁液を遠心して細胞を沈澱させた後、この細胞を無血清ＤＭＥＭ培地で２回洗浄してから、無血清ＤＭＥＭ培地に懸濁して細胞数を測定した。一方、１０％ＦＣＳ（シグマ社製）を含むＤＭＥＭ培地（ギブコ・ビーアールエル社製）（以下「血清入りＤＭＥＭ培地」という）にて、３７℃、５％炭酸ガス存在下で細胞濃度が１×１０$^{6}$細胞／ｍＬを越えないように培養したミエローマ細胞ＳＰ２／０（ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－１５８１）を同様に無血清ＤＭＥＭ培地で洗浄し、無血清ＤＭＥＭ培地に懸濁して細胞数を測定した。回収した細胞の懸濁液とマウスミエローマ懸濁液とを細胞数５：１で混合し、遠心後、上清を完全に除去した。このペレットに、融合剤として５０％（ｗ／ｖ）ポリエチレングリコール１５００（ベーリンガーマンハイム社製）１ｍＬを、ピペットの先でペレットを撹拌しながらゆっくり添加した後、予め３７℃に加温しておいた無血清ＤＭＥＭ培地１ｍＬを２回に分けてゆっくり添加し、さらに７ｍＬの無血清ＤＭＥＭ培地を添加した。遠心後、上清を除去して得られた融合細胞を、以下に記載する限界希釈法によるスクリーニングに供した。ハイブリドーマの選択は、１０％ＦＣＳ、ＩＬ－６（１０ｎｇ／ｍＬ）及びヒポキサンチン（Ｈ）、アミノプテリン（Ａ）、チミジン（Ｔ）（以下「ＨＡＴ」という。：シグマ社製）を含有するＤＭＥＭ培地中で培養することにより行った。さらに、ＨＴ（シグマ社製）、１０％ＦＣＳ、ＩＬ－６含有ＤＭＥＭ培地を用いて限界希釈法によりシングルクローンにした。培養は、９６穴マイクロタイタープレート（ベクトンディッキンソン社製）中で行った。抗ヒトＨＬＡ－ＤＲヒトモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマクローンの選択（スクリーニング）及び各々のハイブリドーマが産生するヒトモノクローナル抗体の特徴付けは、後述する酵素標識免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）及びＦＣＭにより測定することにより行った。

ヒトモノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングは、実施例４及び５に述べるＣｅｌｌ　ＥＬＩＳＡにより、ヒト免疫グロブリンγ鎖（ｈＩｇγ）及びヒト免疫グロブリン軽鎖κを有し、かつヒトＨＬＡ－ＤＲに特異的な反応性を有するヒトモノクローナル抗体を産生する多数のハイブリドーマを得た。

実施例４　ヒト免疫グロブリン軽鎖κ（Ｉｇκ）を有する、ヒト抗ＨＬＡ－ＤＲモノクローナル抗体産生クローンの選択

バーキットリンパ腫細胞Ｄａｕｄｉ（ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＣＬ－２１３）を各ウェルに１×１０$^{5}$個加えた後、ハイブリドーマ上清を加え、４℃で２０分間インキュベートした。次いで、１％ＦＣＳ入りのＰＢＳで２回洗浄し、西洋ワサビペルオキシダーゼで標識されたヤギ抗ヒト免疫グロブリン軽鎖κ（Ｉｇκ）抗体（５０μｇ／ウェル：ＤＡＫＯ社製）を加え、４℃で２０分間インキュベートした。１％ＦＣＳ入りＰＢＳで２回洗浄し、ＴＭＢ発色基質（ＤＡＫＯ社製）を各ウェルに１００μＬずつ加え、室温下で２０分間インキュベートした。各ウェルに０．５Ｍ硫酸（１００μＬ／ウェル）を加え、反応を止めた。波長４５０ｎｍ（参照波長５７０ｎｍ）での吸光度をマイクロプレートリーダー（１４２０　ＡＲＶＯ　マルチラベルカウンター：ＷＡＬＬＡＣ社製）で測定して陽性反応を示した抗体産生クローンを選択した。

実施例５　各モノクローナル抗体のサブクラス同定

Ｄａｕｄｉを各ウェルに１×１０$^{5}$個加えた後、ハイブリドーマ上清を加え、４℃で２０分間インキュベートした。次いで、１％ＦＣＳ入りのＰＢＳで２回洗浄し、各ウェルにそれぞれ西洋ワサビペルオキシダーゼで標識されたヒツジ抗ヒトＩｇＧ１抗体、ヒツジ抗ヒ

トＩｇＧ２抗体、ヒツジ抗ヒトＩｇＧ３抗体又はヒツジ抗ヒトＩｇＧ４抗体（各２０００倍希釈、５０μＬ／ウェル、Ｔｈｅ　Ｂｉｎｄｉｎｇ　Ｓｉｔｅ社製）を加え、室温下で１時間インキュベートした。１％ＦＣＳ入りＰＢＳで３回洗浄後、基質緩衝液（ＴＭＢ、１００μＬ／ウェル、ＤＡＫＯ社製）を各ウェルに加え、室温下で２０分間インキュベートした。次いで、０．５Ｍ硫酸（１００μＬ／ウェル）を加え、反応を止めた。波長４５０ｎｍ（参照波長５７０ｎｍ）での吸光度をマイクロプレートリーダー（１４２０　ＡＲＶＯ　マルチラベルカウンター：ＷＡＬＬＡＣ社製）で測定し、各クローンのサブクラスを決定した。どのサブクラスにも陽性反応のなかったクローンについては、ＩｇＧではないため選択から除外した。

結果のうち最終的に選択したクローンのみの結果を表１に示す。

表１

選抜した抗HLA-DRモノクローナル抗体の性質

| | サブクラス | 同種異系リンパ球混合による免疫反応に対する抑制活性 | L929に対する反応 | L929/HLA-DRに対する反応 |
|---|---|---|---|---|
| human IgG | poly | − | − | − |
| HD3 | IgG1 | ++ | − | + |
| HD4 | IgG1 | ++ | − | + |
| HD6 | IgG1 | +++ | − | + |
| HD7 | IgG3 | + | − | + |
| HD8 | IgG2 | + | − | + |
| HD10 | IgG2 | + | − | + |

実施例６　正常ヒト単核球及び正常ヒト樹状細胞の取得方法

最初に正常ヒト末梢血由来単核球をＦｉｃｏｌｌ（Ｆｉｃｏｌｌ－ＰａｑｕｅＰＬＵＳ：Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｐｈａｒｍａｃｉａ　Ｂｉｏｔｅｃｈ社製）を用いて定法に従って調製した。抗凝固剤としてクエン酸ナトリウム液を含んだ採血バッグ（テルモ社製）に採取した正常ヒト血液を遠心分離（６００Ｇ、室温、５分）し、細胞分画と血漿を分離した。細胞分画をＰＢＳで希釈してＦｉｃｏｌｌに重層し、比重遠心（４００Ｇ、室温、３０分間）により単核細胞を分離した。中間層を単核球として抽出してＰＢＳで２回洗浄したのち、さらにＰＢＳで希釈して１００Ｇで１０分間遠心分離し、上清中に残留した血小板を除去した。以上の方法で正常ヒト末梢血由来単核球（ＰＢＭＣ）を取得した。

次に、取得したＰＢＭＣを磁気ビーズ付ＣＤ１４抗体（ミルテニバイオテック（ＭＢ）社製）で３０分間４℃で反応させ、ＭＡＣＳ分離カラム（ＭＢ社製）を通してＣＤ１４陽性細胞のポジティブセレクションを行った。ＭＡＣＳ分離カラムの使用方法は説明書に習って行った。得られたＣＤ１４陽性細胞をＧＭ－ＣＳＦ（最終濃度５０ｎｇ／ｍＬ：キリンビール社医薬探索研究所にて調製）及びインターロイキン４（最終濃度２００ｎｇ／ｍＬ：ジェンザイム社製）を含む１０％ＦＣＳ含有ＲＰＭＩ培地で５日から８日培養した。さらにその後、リポポリサッカライド（ＬＰＳ：最終濃度４０ｎｇ／ｍＬ：ディフコ社製）を添加して１晩培養し、成熟樹状細胞（成熟ＤＣ）として使用した。

実施例７　同種異系リンパ球混合による免疫反応に対する抑制活性

主要組織適合抗原（ＭＨＣ）の異なる同種異系の移植においては、Ｔ細胞が非自己（組織不適合）のＭＨＣ分子複合体（アロ抗原）を認識することで活性化し拒絶反応を引き起こ

す。ヒトのＭＨＣはＨＬＡ（ｈｕｍａｎ　ｌｅｕｋｏｃｙｔｅ　ａｎｔｉｇｅｎ）と呼ばれ、ＨＬＡ－Ａ，Ｂ，Ｃの属するクラスＩ抗原と、ＨＬＡ－ＤＰ，ＤＱ，ＤＲの属するクラスＩＩ抗原があり、さらにそれぞれの分子が多型性を有するため、ヒトのＨＬＡの組み合せは数千通り可能となり、他人の間では組織不適合になる可能性がきわめて高くなっている。同種異系リンパ球混合培養は、組織適合抗原の異なる（以下便宜上ドナーＡ、ドナーＢという）リンパ球を混合培養することで、アロ抗原に反応するＴ細胞の増殖をｉｎ　ｖｉｔｒｏにおいて調べる試験である。

そこで、実施例４乃至５から選択されたハイブリドーマの培養上清を用いて同種異系リンパ球混合による免疫反応に対する抑制活性を測定した。実験例６記載の方法で正常ヒト末梢血単核球を取得した。ドナーＡ単核球はマイトマイシンＣを含むＲＰＭＩ１６４０培地（２５μｇ／ｍＬ、３７℃、３０分）と反応させて細胞増殖を抑え、反応後３回以上ＲＰＭＩ１６４０培地で洗浄し、$1\times10^{6}$／ｍＬになるようにＲＰＭＩ１６４０培地に懸濁した。ドナーＢ単核球は$1\times10^{5}$個／ウェルになるように９６穴プレートに分注し、遠心分離して培地を除いた後、培養上清を１００μＬ／ウェルで添加し、４℃下で３０分放置した。

次に、ドナーＡ単核球を１００μＬ／ウェルでドナーＢと培養上清が入った９６穴プレートに分注し、３７℃、４日間、５％$CO_2$存在下で培養した後、$^{3}$Ｈチミジン（Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｐｈａｒｍａｃｉａ　Ｂｉｏｔｅｃｈ社製）を１．０μＣｉ／ウェルとなるように添加して、さらに３７℃、１６～２０時間、５％$CO_2$存在下で培養した。Ｍｉｃｒｏ９６　Ｈａｒｖｅｓｔｅｒ（ＳＫＡＴＲＯＮ社製）を用いて細胞に取り込まれた$^{3}$Ｈチミジンをグラスフィルターマット（Ｐｒｉｎｔｅｄ　Ｆｉｌｔｅｒｍａｔ：Ｗａｌｌａｃ社製）に回収し、乾燥後シンチレーター（Ｂｅｔａｐ；Ｓｃｉｎｔ：Ｗａｌｌａｃ社製）によく浸し、パッケージング後、β線量を液体シンチレーションカウンター（１２０５ＢＥＴＡＰＬＡＴＥ：Ｗａｌｌａｃ社製）で活性測定した。

その結果、選抜した抗ヒトＨＬＡ－ＤＲ抗体の性質を表１に示す。それらのうち、ＨＤ８、ＨＤ１０、ＨＤ４及びＨＤ６は、平成１３年（２００１年）１０月１１日付けで独立行政法人産業技術総合研究所（茨城県つくば市東１丁目１番地１　中央第６）に国際寄託した。受託番号は、ＨＤ８はＦＥＲＭ　ＢＰ－７７７３、ＨＤ１０はＦＥＲＭ　ＢＰ－７７７４、ＨＤ４はＦＥＲＭ　ＢＰ－７７７１、ＨＤ６はＦＥＲＭ　ＢＰ－７７７２である。

実施例８　各抗体の調製

実施例４乃至５から得られたハイブリドーマの培養上清からのヒト抗ＨＬＡ－ＤＲモノクローナル抗体の精製は以下の方法で行った。ヒト抗ＨＬＡ－ＤＲモノクローナル抗体を含む培養上清をｒｍｐ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ａ（アマシャムファルマシアバイオテク社製）及び０．８×４０ｃｍカラム（バイオラッド社製）を用い、吸着緩衝液としてＰＢＳ、溶出緩衝液として０．０２Ｍグリシン緩衝液（ｐＨ３）を用いてアフィニティー精製した。溶出画分は1Ｍ　Ｔｒｉｓ（ｐＨ９．０）を添加してｐＨ７．２付近に調整した。調製された抗体溶液は、透析膜（１００００カット、Ｓｐｅｃｔｒｕｍ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ社製）を用いてＰＢＳに置換し、孔径０．２２μｍのメンブランフィルターＭＩＬＬＥＸ－ＧＶ（ミリポア社製）でろ過滅菌し、精製ヒト抗ＨＬＡ－ＤＲモノクローナル抗体を得た。精製抗体の濃度は２８０ｎｍの吸光度を測定し、１ｍｇ／ｍＬを１．４ＯＤとして算出した。

ヒト抗ＨＬＡ－ＤＲモノクローナル抗体を含む培養上清の調製は以下の方法にて行った。まずヒト抗ＨＬＡ－ＤＲモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを１０ｎｇ／ｍｌ　ＩＬ－６、１０％　Ｆｅｔａｌ　Ｃａｌｆ　Ｓｅｒｕｍ（ＦＣＳ：ＳＩＧＭＡ社製）含有ｅＲＤＦ培地（極東製薬社製）に馴化した。次に、その一部を抗体精製を目的として、ウシインシュリン（５μｇ／ｍＬ、ギブコ・ビーアールエル社製）、ヒトトランスフェリン（５μｇ／ｍＬ、ギブコ・ビーアールエル社製）、エタノールアミン（０．０１ｍＭ、シグマ社製）、亜セレン酸ナトリウム（$2.5\times10^{-5}$ｍＭ、シグマ社製）、１％　Ｌｏｗ　ＩｇＧ　ＦＣＳ（ＨｙＣｌｏｎｅ社製）含有ｅＲＤＦ培地（極東製薬社製）に馴化した。この馴化したハイブリドーマを凍結保存した。フラスコにて培養し、ハイブリドーマの生

細胞率が９０％になった時点で培養上清を回収した。回収した上清は、１０μｍと０．２μｍのフィルター（ゲルマンサイエンス社製）に供し、ハイブリドーマ等の雑排物を除去した。

実施例９　精製ヒト抗ＨＬＡ－ＤＲモノクローナル抗体による同種異系リンパ球混合による免疫反応に対する抑制活性

同種異系リンパ球混合培養は、組織適合抗原の異なる（以下便宜上ドナーＡ、ドナーＢという）リンパ球を混合培養することで、アロ抗原に反応するＴ細胞の増殖をｉｎ　ｖｉｔｒｏにおいて調べる試験であるが、さらに、ドナーＡの末梢血からｉｎ　ｖｉｔｒｏで誘導した単球由来の成熟樹状細胞（ＤＣ）とドナーＢの末梢血から分離したＴ細胞のみを混合培養することで、貪食細胞などによる抗体依存性細胞傷害活性（ＡＤＣＣ）を除外した条件下で同様のアロ抗原に対するＴ細胞の反応性を調べることができる。そこで、抗ＨＬＡ－ＤＲモノクローナル抗体の存在下で同種異系のＤＣとＴ細胞を用いた混合培養を行い、Ｔ細胞のアロ抗原反応性に対する抗ＨＬＡ－ＤＲモノクローナル抗体の作用を調べた。

具体的には、丸底９６ウェルプレート（Ｆａｌｃｏｎ社製）にドナーＡの成熟ＤＣを２×１０$^{5}$個／ｍＬになるように１０％ＦＣＳを含むＲＰＭＩ１６４０培地（ＲＰＭＩ－１０％　ＦＣＳ）に浮遊させた。抗ＨＬＡ－ＤＲモノクローナル抗体、陰性コントロールとしてヒトポリクローナルＩｇＧ（ｈＩｇＧ）及び陽性コントロールとしてマウス抗ＨＬＡ－ＤＲモノクローナル抗体Ｌ２４３（ＡＴＣＣ　ＨＢ－５５）は、２００、４０、８ｍｇ／ｍＬになるようにＲＰＭＩ－１０％　ＦＣＳで希釈した。また、ドナーＢの末梢血より分離した純度９９％以上のＴ細胞を１×１０$^{6}$個／ｍＬとなるようにＲＰＭＩ－１０％　ＦＣＳに浮遊させた。最初に、ドナーＡ由来の成熟ＤＣと抗ＨＬＡ－ＤＲモノクローナル抗体を各５０μＬずつ９６穴プレート上で混合し、４℃で３０分放置した。次に、ドナーＢ由来のＴ細胞１００μＬを混合し、３７℃、５日間、５％$CO_2$存在下で培養した後、$^{3}$Ｈチミジン（Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｐｈａｒｍａｃｉａ　Ｂｉｏｔｅｃｈ社製）を１．０μＣｉ／ウェルとなるように添加して、さらに３７℃、１６～２０時間、５％$CO_2$存在下で培養した。Ｍｉｃｒｏ９６　Ｈａｒｖｅｓｔｅｒ（ＳＫＡＴＲＯＮ社製）を用いて細胞に取り込まれた$^{3}$Ｈチミジンをグラスフィルターマット（Ｐｒｉｎｔｅｄ　Ｆｉｌｔｅｒｍａｔ：Ｗａｌｌａｃ社製）に回収し、乾燥後シンチレーター（Ｂｅｔａｐ；Ｓｃｉｎｔ：Ｗａｌｌａｃ社製）によく浸し、パッケージング後、β線量を液体シンチレーションカウンター（１２０５ＢＥＴＡＰＬＡＴＥ：Ｗａｌｌａｃ社製）で活性測定した。

その結果を図１に示す。ＨＤ４、ＨＤ６、ＨＤ８、ＨＤ１０はｈＩｇＧ群と比較して用量依存的な免疫抑制活性を示したが、ＨＤ８、ＨＤ４及びＨＤ１０はＬ２４３と比して弱く、ＨＤ６は陽性コントロール抗体のＬ２４３と同等又はそれ以上の抑制活性を示した。

以上より、ＨＤ８、ＨＤ４及びＨＤ１０は免疫抑制活性の弱い抗体として、またＨＤ６は免疫抑制剤としての可能性が示唆された。

実施例１０　ＨＬＡ－ＤＲ発現細胞に対する各モノクローナル抗体の反応試験

実施例１で作成したＨＬＡ－ＤＲ発現Ｌ９２９細胞に対する、実施例３で取得した精製各モノクローナル抗体の反応性の検討を、ＦＣＭ解析で行った。２×１０$^{7}$／ｍＬの濃度で、Ｌ９２９細胞及びＨＬＡ－ＤＲ発現Ｌ９２９細胞を、０．１％アジ化ナトリウム及び１％牛胎児血清含有したＰＢＳ（Ｓｔａｉｎｉｎｇ　Ｍｅｄｉｕｍ、以下ＳＭ）に浮遊させ、９６穴丸底プレートに１００μｌ／ウェルで分注した。遠心分離（６００Ｇ、４℃、２分）した後、上清を除去し、実施例３で培養したハイブリドーマの培養上清（５０μｌ）を加えて撹拌した後、氷温下３０分間静置してから、遠心分離（６００Ｇ、４℃、２分）して上清を除去した。ペレットを１００μｌ／ウェルのＳＭで２回洗浄した後、０．０１２５ｍｇ／ｍＬのＲＰＥ蛍光標識ウサギ抗ヒトＩｇκ　Ｆ（ａｂ’）$_2$抗体（ＤＡＫＯ社製）３０μＬを加え、氷温下３０分間インキュベートした。ＳＭで２回洗浄した後、ＳＭに懸濁し、ＦＣＭで各細胞の蛍光強度を測定した。

その結果は前述の表１に示す。いずれの抗体もＨＬＡ－ＤＲ発現Ｌ９２９細胞にのみ強い結合活性を有し、Ｌ９２９細胞への結合活性は認められなかったことから、ＨＬＡ－ＤＲと特異的に結合する抗体であることが判明した。

実施例１１　マウス担癌モデルに対する精製ヒト抗ＨＬＡ－ＤＲモノクローナル抗体の効果

実施例８から得られた精製ヒト抗ＨＬＡ－ＤＲモノクローナル抗体の効果を、以下に記載する方法に従ってマウス担癌モデルを用いて検討した。

まず５週令のＣ．Ｂ－１７／ＩＣＲ－ＳＣＩＤマウス（日本クレア（株）社製）を購入し、６週齢時に抗アシアロＧＭ１抗血清（和光化学社製）を１０μＬ／マウス個体で希釈して静脈内投与した。翌日、バーキットリンパ腫細胞Ｒａｊｉ（ＡＴＣＣ　ＣＣＬ－８６）を５×１０$^{6}$／マウス個体で静脈内投与した。Ｒａｊｉ移植より５日後、マウスの尾静脈内に精製ヒト抗ＨＬＡ－ＤＲモノクローナル抗体を０．１、１μｇ／マウス個体の用量で１回投与した。抗体の陰性コントロールとして、同量のヒト抗ＨＳＡ抗体を使用した。移植後の生存率を約３ヶ月間以上観察した。

以上の実験の結果を図２に示す。精製ヒト抗ＨＬＡ－ＤＲモノクローナル抗体を０．１μｇ／マウス個体で投与した群では、９０日後の生存数が１群あたり５匹中、ＨＤ８は３匹、ＨＤ１０及びＨＤ４は１匹であった（図２Ｂ）。一方、１．０μｇ／マウス個体で投与した群では、生存数が１群あたり５匹中、ＨＤ８は３匹、ＨＤ１０は５匹、ＨＤ４は２匹であった（図２Ａ）。陰性コントロールである抗ＨＳＡ抗体投与群では、Ｒａｊｉ移植後６０日以内に全例死亡した。

抗体投与時のマウス体重は約２０ｇであることから、０．１及び１μｇ／マウス個体は５及び５０μｇ／ｋｇ体重になり、ＨＤ８は非常に低用量で抗腫瘍効果を発揮することが判明した。さらに実施例９の結果を総合すると、ＨＤ８は免疫抑制活性の弱く且つ抗腫瘍活性の強い抗体であり、副作用の少ない抗癌剤としての可能性が示唆された。

実施例１２　モノクローナル抗体をコードする遺伝子の調製及び組換え抗体発現ベクターの構築

（１）ＨＤ４、ＨＤ８抗体遺伝子のｃＤＮＡクローニングと発現ベクター作製

ハイブリドーマＨＤ４、ＨＤ８を１０ｎｇ／mL　ＩＬ－６（Ｒ&Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ社製）、１０％　Ｆｅｔａｌ　Ｂｏｖｉｎｅ　Ｓｅｒｕｍ（ＳＩＧＭＡ社製）含有ｅＲＤＦ培地（極東製薬社製）で培養し、遠心分離により細胞を集めた後ＴＲＩＺＯＬ（ギブコビーアールエル社製）を添加し、取扱説明書にしたがってＴｏｔａｌ　ＲＮＡを抽出した。

抗体ｃＤＮＡの可変領域のクローニングは、ＳＭＡＲＴ　ＲＡＣＥ　ｃＤＮＡ　ａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ　Ｋｉｔ（クローンテック社製）を用い、添付の説明書にしたがって行った。

５μｇのｔｏｔａｌ　ＲＮＡを鋳型として、１ｓｔ　ｓｔｒａｎｄ　ｃＤＮＡを作製した。

１）１ｓｔ　ｓｔｒａｎｄ　ｃＤＮＡの合成

Ｔｏｔａｌ　ＲＮＡ　５μｇ／３μＬ

５’ＣＤＳ　１μＬ

ＳＭＡＲＴ　ｏｌｉｇｏ　１μＬ

上記組成の反応液を７０℃で２分間インキュベートした後、

５×Ｂｕｆｆｅｒ　２μＬ

ＤＴＴ　１μＬ

ＤＮＴＰ　ｍｉｘ　１μＬ

Ｓｕｐｅｒｓｃｒｉｐｔ　ＩＩ　１μＬ

を加え４２℃で１．５時間インキュベートした。

さらに、１００μＬのＴｒｉｃｉｎｅ　Ｂｕｆｆｅｒを加えた後、７２℃で７分間インキュベートし、１ｓｔ　ｓｔｒａｎｄ　ｃＤＮＡを取得した。

２）ＰＣＲによる重鎖遺伝子、軽鎖遺伝子の増幅及び組換え抗体発現ベクターの構築

ｃＤＮＡの増幅には、Ｔａｋａｒａ社のＺ－Ｔａｑを用いた。

ｃＤＮＡ　２μＬ

１０ｘＺ－Ｔａｑ　Ｂｕｆｆｅｒ　５μＬ

ｄＮＴＰ　ｍｉｘ　４μＬ

Ｚ－Ｔａｑ　１μＬ
プライマー１
プライマー２
上記組成の反応液を再蒸留水にて最終容量５０μＬとし、ＰＣＲに供した。
重鎖の増幅には、ＵＭＰ（ＳＭＡＲＴ　ＲＡＣＥ　ｃＤＮＡ　ａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ　Ｋｉｔ；クローンテック社製）とｈｈ－６プライマー（５’－ＧＧＴ　ＣＣＧ　ＧＧＡ　ＧＡＴ　ＣＡＴ　ＧＡＧ　ＧＧＴ　ＧＴＣ　ＣＴＴ－３’）（配列番号５）を用い、９８℃１秒、６８℃３０秒のサイクルを３０回繰り返した。さらに、この反応液１μＬを鋳型とし、ＮＵＭＰ（ＳＭＡＲＴ　ＲＡＣＥ　ｃＤＮＡ　ａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ　Ｋｉｔ；クローンテック社製）とｈｈ－３プライマー（５’－ＧＴＧ　ＣＡＣ　ＧＣＣ　ＧＣＴ　ＧＧＴ　ＣＡＧ　ＧＧＣ　ＧＣＣ　ＴＧ－３’）（配列番号６）を用いて、９８℃１秒、６８℃３０秒のサイクルを２０回繰り返した。この後、増幅したＰＣＲ産物をＰＣＲ　ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ　ｋｉｔ（キアゲン社製）により精製し，ｈｈ－４（５’－ＧＧＴ　ＧＣＣ　ＡＧＧ　ＧＧＧ　ＡＡＧ　ＡＣＣ　ＧＡＴ　ＧＧ－３’）（配列番号７）をプライマーとして、塩基配列の決定を行った。配列情報を基に、ＨＤ４重鎖特異的プライマーｔｎＨＤ４Ｓａｌ（５’－ａｔａ　ｔｇｔ　ｃｇａ　ｃＣＣ　ＡＧＣ　ＣＣＴ　ＧＧＧ　ＡＴＴ　ＴＴＣ　ＡＧＧ　ＴＧＴ　ＴＴＴ　Ｃ－３’）（配列番号８）と、ＨＤ８重鎖特異的プライマーｔｎＨＤ８Ｓａｌ（５’－ａｔａ　ｔｇｔ　ｃｇａ　ｃＴＧＧ　ＣＴＧ　ＡＣＣ　ＡＧＧ　ＧＣＡ　ＧＴＣ　ＡＣＣ　ＡＧＡ　Ｇ－３’）（配列番号９）を合成し、このプライマーを用いて反対方向からも配列を決定した。特異的プライマーとｔｎＣＨＮｈｅ（５’－ｇａｔ　ｇｇｇ　ｃｃｃ　ｔｔｇ　ｇｔｇ　ｃｔａ　ｇｃｔ　ｇａｇ　ｇａｇ　ａｃｇ　ｇ－３’）（配列番号１０）を用いてＰＣＲを行い（９８℃１秒、６０℃３０秒、７２℃３０秒）、重鎖増幅ｃＤＮＡ断片をＳａｌＩ、ＮｈｅＩで消化し、同一酵素で解裂されていたＮ５ＫＧ１－Ｖａｌ　Ｌａｒｋベクター（ＩＤＥＣ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ，Ｎ５ＫＧ１（ＵＳ　ｐａｔｅｎｔ　６００１３５８）の改変ベクター）、に導入した。挿入された配列がｄｉｒｅｃｔ　ｓｅｑｕｅｎｃｅによって決定されたものと同一であることを、ベクターを鋳型として配列を決定することにより確認した。
軽鎖は、ＵＭＰ（ＳＭＡＲＴ　ＲＡＣＥ　ｃＤＮＡ　ａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ　Ｋｉｔ；クローンテック社製）とｈｋ－２（５’－ＧＴＴ　ＧＡＡ　ＧＣＴ　ＣＴＴ　ＴＧＴ　ＧＡＣ　ＧＧＧ　ＣＧＡ　ＧＣ－３’）（配列番号１１）プライマーを使って、９８℃１秒、６８℃３０秒のサイクルを３０回繰り返して増幅した。さらに、この反応液１μＬを鋳型とし、ＮＵＭＰ（ＳＭＡＲＴ　ＲＡＣＥ　ｃＤＮＡ　ａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ　Ｋｉｔ；クローンテック社製）とｈｋ－６（５’－ＴＧＧＣ　ＧＧＧ　ＡＡＧ　ＡＴＧ　ＡＡＧ　ＡＣＡ　ＧＡＴ　ＧＧＴ　Ｇ－３’）（配列番号１２）を用いて、９８℃１秒、６８℃３０秒のサイクルを２０回繰り返した。この後、増幅したＰＣＲ産物をＰＣＲ　ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ　ｋｉｔ（キアゲン社製）により精製し、ｈｋ－６プライマー（配列番号１２）を用いて塩基配列を決定した。配列情報を基に、ＨＤ４軽鎖特異的プライマーｔｎＨＤ４Ｂｇｌ（５’－ａｔａ　ｔａｇ　ａｔｃ　ｔＧＣ　ＴＧＣ　ＴＣＡ　ＧＴＴ　ＡＧＧ　ＡＣＣ　ＣＡＧ　ＡＧＧ　ＧＡＡ　ＣＣ－３’）（配列番号１３）とＨＤ８軽鎖特異的プライマーｔｎＨＤ８Ｂｇｌ（５’－ａｔａ　ｔａｇ　ａｔｃ　ｔＧＧ　ＧＡＧ　ＴＣＡ　ＧＡＣ　ＣＣＡ　ＣＴＣ　ＡＧＧ　ＡＣＡ　ＣＡＧ　Ｃ－３’）（配列番号１４）を合成し、このプライマーを用いて、反対方向からも配列を決定した。特異的プライマーとｔｎＣｋＢｓｉ（５’－ａａｇ　ａｃａ　ｇａｔ　ｇｇｔ　ｇｃａ　ｇｃｃ　ａｃｃ　ｇｔａ　ｃｇｔ　ｔｔｇ　ａｔ－３’）（配列番号１５）を用いてＰＣＲを行い（９８℃１秒、６０℃３０秒、７２℃３０秒）、軽鎖増幅ｃＤＮＡ断片をＢｇｌＩＩ、ＢｓｉＷＩで消化し、同一酵素で解裂されていたＮ５ＫＧ１－Ｖａｌ　Ｌａｒｋベクターに導入した。挿入された配列がｄｉｒｅｃｔ　ｓｅｑｕｅｎｃｅによって決定されたものと同一であることを、ベクターを鋳型として配列を決定することにより確認した。
ＨＤ４の重鎖可変領域、及び軽鎖可変領域をコードするＤＮＡ並びに重鎖可変領域及び軽

鎖可変領域のアミノ酸配列をそれぞれ以下に示す。

〈HD4 重鎖可変領域〉（配列番号１６）

GTCGACCCAGCCCTGGGATTTTCAGGTGTTTTCAGGTGTTTTCATTTGGTGATCAGGACTGAACAGAGAGA
ACTCACCATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGCTTTTTCTTGTGGCTATTTTAAAAGGTGTCCAGTGTGAGGTGCA
ACTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATT
CACCTTTAGCAGCTATGCCATGACCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGGTAT
TAGTGGTGGTGGTGATAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTC
CAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAGAGA
TCATGGTTCGGGGAGTTATTATCCCTACTGGTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTC
AGCTAGC

〈HD4 重鎖可変領域〉（配列番号１７）

MEFGLSWLFLVAILKGVQCEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMTWVRQAPGKGLEWVSGISG
GGDSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDHGSGSYYPYWFDYWGQGTLVTVSSA

〈HD4 軽鎖可変領域〉（配列番号１８）

AGATCTGCTGCTCAGTTAGGACCCAGAGGGAACCATGGAAACCCCAGCGCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACT
CTGGCTCCCAGATACCACCGGAGAACTTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGA
AAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCCGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACC
TGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAGTGG
CAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTG
TCAGCAGTATGGTAGCTCACCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGTACG

〈HD4 軽鎖可変領域〉（配列番号１９）

METPAQLLFLLLLWLPDTTGELVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSRYLAWYQQKPGQAPRLLIYGA
SSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPLTFGGGTKVEIKRT

重鎖ＤＮＡの翻訳開始点は、配列番号１６の５’末端から７９番目のアデニン（Ａ）からはじまるＡＴＧコドンであり、抗体可変領域と定常領域の境界は５’末端から５０４番目のアデニン（Ａ）と５０５番目のグアニン（Ｇ）間に位置する。アミノ酸配列において、重鎖可変領域は配列番号１７のＮ末端から１４２番目のセリン（Ｓ）残基までであり、１４３番目のアラニン（Ａ）以降が定常領域である。精製された重鎖蛋白質のＮ末端分析により、重鎖のシグナル配列は配列番号１７のＮ末端より１９番目のシステイン（Ｃ）までであり、成熟体のＮ末端は配列番号１７の２０番目のグルタミン酸（Ｅ）であることが明らかとなった。従って、配列番号１７のアミノ酸配列中マチュア部分は２０番目のグルタミン酸から１４２番目のセリンまでの部分である。

軽鎖ＤＮＡの翻訳開始点は、配列番号１８の５’末端から３５番目のＡからはじまるＡＴＧコドンであり、可変領域は５’末端から４１８番目のアデニン（Ａ）までである。アミノ酸配列において、可変領域は配列番号１９のＮ末端から１２８番目のリジン（Ｋ）までである。精製された軽鎖蛋白質のＮ末端分析により、軽鎖のシグナル配列は配列番号１９のＮ末端より２０番目のグリシン（Ｇ）までであり、成熟体のＮ末端は配列番号１９の２１番目のグルタミン酸（Ｅ）であることが明らかとなった。従って、配列番号２０のアミノ酸配列中、マチュア部分は２１番目のグルタミン酸から１２８番目のリジンまでの部分である。

ＨＤ８重鎖可変領域、及び軽鎖可変領域をコードするＤＮＡ並びに重鎖可変領域及び軽鎖可変領域のアミノ酸配列をそれぞれ以下に示す。

〈HD8 重鎖可変領域〉（配列番号２０）

GTCGACTGGCTGACCAGGGCAGTCACCAGAGCTCCAGACAATGTCTGTCTCCTTCCTCATCTTCCTGCCCG
TGCTGGGCCTCCCATGGGGTGTCCTGTCACAGGTTCAGCTGCAGCACTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCT
CGCAGACCCTCTCACTCACCTGTGCCATCTCCGGGGACAGTGTCTCTAGCAACAGTGCTTCTTGGAACTGGA
TCAGGCAGTCCCCATCGAGGGGCCTTGAGTGGCTGGGAAGGACATACTACAGGTCCAAGTGGTATAATGATT
ATGCAGTATCTGTGAAAAGTCGAATAGTCATCAACCCAGACACATCCAAGAACCAGTTCTCCCTGCAGCTGA
ACTCTGTGACTCCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGAAAATTTCTATGGTTCGGAGACTTGTC
ATAAGAAGTATTACTGCTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGC

〈HD8 重鎖可変領域〉（配列番号２１）

MSVSFLIFLPVLGLPWGVLSQVQLQHSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNSASWNWIRQSPSRGLEWLGR
TYYRSKWYNDYAVSVKSRIVINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARENFYGSETCHKKYYCYGMDVWGQ
GTTVTVSSAS

〈HD8 軽鎖可変領域〉（配列番号２２）

AGATCTGGGAGTCAGACCCACTCAGGACACAGCATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTTCTG
CTGCTCTGGCTCCCAGGTGCCAGATGTGCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTA
GGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGCAGTGCTTTAGCCTGGTATCAGCAGAAA
CCAGGGAAAGCTCCTAAACTCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTGGAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGC
GGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTAC
TGTCAACAGTTTAATAGTTTCCCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGTACG

〈HD8 軽鎖可変領域〉（配列番号２３）

MDMRVPAQLLGLLLLWLPGARCAIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWYQQKPGKAPKLLIYD
ASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSFPLTFGGGTKVEIKRTV

重鎖ＤＮＡの翻訳開始点は、配列番号２０の５’末端から４１番目のアデニン（Ａ）からはじまるＡＴＧコドンであり、抗体可変領域と定常領域の境界は５’末端から４９６番目のアデニン（Ａ）と４９７番目のグアニン（Ｇ）間に位置する。アミノ酸配列において、

重鎖可変領域は配列番号２１のＮ末端から１５２番目のセリン（Ｓ）残基までであり、１５３番目のアラニン（Ａ）以降が定常領域である。精製された重鎖蛋白質のＮ末端分析により、重鎖のシグナル配列は配列番号２１のＮ末端より２０番目のセリン（Ｓ）までであり、成熟体のＮ末端は配列番号２１の２１番目のグルタミン（Ｑ）であることが明らかとなった。従って、配列番号２１のアミノ酸配列中、マチュア部分は２１番目のグルタミン酸から１５２番目のセリンまでの部分である。
軽鎖ＤＮＡの翻訳開始点は、配列番号２２の５’末端から３４番目のＡからはじまるＡＴＧコドンであり、可変領域は５’末端から４２０番目のアデニン（Ａ）までである。アミノ酸配列において、可変領域は配列番号２３のＮ末端から１２９番目のリジン（Ｋ）までである。精製された軽鎖蛋白質のＮ末端分析により、軽鎖のシグナル配列は配列番号２３のＮ末端より２２番目のシステイン（Ｃ）までであり、成熟体のＮ末端は配列番号２３の２３番目のアデニン（Ａ）であることが明らかとなった。従って、配列番号２３のアミノ酸配列中、マチュア部分は２３番目のアデニンから１２９番目のリジンまでの部分である。

表２　合成DNAの塩基配列

合成DNAの塩基配列

| No | ﾌﾟﾗｲﾏｰ名 | 配列（5' to 3'） | 長さ | 配列番号 |
|---|---|---|---|---|
| 1 | hh-6 | GGT CCG GGA GAT CAT GAG GGT GTC CTT | 27 | 5 |
| 2 | hh-3 | GTG CAC GCC GCT GGT CAG GGC GCC TG | 26 | 6 |
| 3 | hh-4 | GGT GCC AGG GGG AAG ACC GAT GG | 23 | 7 |
| 4 | tnHD4Sal | ata tgt cga cCC AGC CCT GGG ATT TTC AGG TGT TTT C | 37 | 8 |
| 5 | tnHD8Sal | ata tgt cga cTGG CTG ACC AGG GCA GTC ACC AGA G | 35 | 9 |
| 6 | tnCHNhe | gat ggg ccc ttg gtg cta gct gag gag acg g | 31 | 10 |
| 7 | hk-2 | GTT GAA GCT CTT TGT GAC GGG CGA GC | 26 | 11 |
| 8 | hk-6 | T GGC GGG AAG ATG AAG ACA GAT GGT G | 26 | 12 |
| 9 | tnHD4Bgl | ata tag atc tGC TGC TCA GTT AGG ACC CAG AGG GAA CC | 38 | 13 |
| 10 | tnHD8Bgl | ata tag atc tGG GAG TCA GAC CCA CTC AGG ACA CAG C | 37 | 14 |
| 11 | tnCkBsi | aag aca gat ggt gca gcc acc gta cgt ttg at | 32 | 15 |

実施例１３　サブクラス組換え型ベクターの作成
ＨＤ４及びＨＤ８については、各抗体の可変領域を以下の各種ベクターに組み込んだ。ＩｇＧ１タイプにはＮ５ＫＧ１－Ｖａｌ　Ｌａｒｋベクター、ＩｇＧ４タイプにはＮ５ＫＧ４　Ｌａｒｋ（いずれもＩＤＥＣ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ製で、ＵＳ　ｐａｔｅｎｔ　６００１３５８に記載されているＮ５ＫＧ１の改変ベクターである。Ｎ５ＫＧ１－Ｖａｌ　ＬａｒｋについてはＮ５ＫＧ１と同様にＩｇＧ１を保持したままの改変、Ｎ５ＫＧ４　ＬａｒｋについてはＩｇＧ４タイプに組替えたものである。）、ＩｇＧ２タイプにはＮ５ＫＧ１－Ｖａｌ　Ｌａｒｋの重鎖定常配列部分をＩｇＧ２タイプに組替えたベクター（Ｎ５ＫＧ２）を用い、実施例１２の方法と同様にベクターにＨＤ４及びＨＤ８の可変領域を組み込んだ。新たに、ＩｇＧ１タイプ或いはＩｇＧ２タイプのベクターに組み込まれている重鎖定常部分のＥＵナンバリングシステムにおける３３１番目のプロリン（Ｐ）をコードする配列ＣＣＣをセリン（Ｓ）をコードするＴＣＣに変異させた（Ｍｉ－Ｈｕａ　Ｔａｏ，ｅｔ　ａｌ．１９９３．Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ）ベクターを作成（以下、順にＮ５ＫＧ１Ｓｅｒ、Ｎ５ＫＧ２Ｓｅｒと書く）し、実施例１２の方法と同様にベクターにＨＤ４及びＨＤ８の可変領域を組み込んだ。以下に説明する図３及び表３中、例えばサブクラスをＩｇＧ１のＨＤ４抗体はＨＤ４ＩｇＧ１又はＨＤ４Ｇ１と記し、さらに重鎖定常部分のＥＵナンバリングシステムにおける３３１番目のプロリン（Ｐ）をコードする配列

ＣＣＣをセリン（Ｓ）をコードするＴＣＣに変異させた遺伝子の発現抗体はＨＤ４ＩｇＧ１Ｓｅｒ又はＨＤ４Ｇ１Ｓｅｒと記する。

表３　組換え型ベクター及び産生される組換え抗体の名称

組換え抗体とその細胞傷害性活性

| 抗体 | ベクター名称 | サブクラス | 組換え抗体の名称 | ADCC活性 | CDC活性 |
|---|---|---|---|---|---|
| HD4 | N5KG1-Val Lark | IgG1 | HD4G1 | + | + |
| HD4 | N5KG2Ser | IgG2Ser | HD4G2Ser | - | - |
| HD4 | N5KG4 Lark | IgG4 | HD4G4 | - | - |
| HD8 | N5KG1-Val Lark | IgG1 | HD8G1 | + | + |
| HD8 | N5KG1Ser | IgG1Ser | HD8G1Ser | + | - |
| HD8 | N5KG2 | IgG2 | HD8G2 | - | + |
| HD8 | N5KG2Ser | IgG2Ser | HD8G2Ser | - | - |
| HD8 | N5KG4 Lark | IgG4 | HD8G4 | - | - |

実施例１４　組換え型抗体の作製

実施例１２及び１３で構築した組換え型抗体発現ベクターを宿主細胞に導入し、組換え型抗体発現細胞を作製した。発現のための宿主細胞には、例えばＣＨＯ細胞のｄｈｆｒ欠損株（ＡＴＣＣ　ＣＲＬ－９０９６）、ＣＨＯ－Ｒａｓ（Ｋａｔａｋｕｒａ　Ｙ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｃｙｔｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，３１：１０３－１０９，１９９９）、ＨＥＫ２９３Ｔ（ＡＴＣＣ　ＣＲＬ－１１２６８）などが用いられる。

宿主細胞へのベクターの導入はエレクトロポレーションやリポフェクションになどにより実施した。エレクトロポレーションは抗体発現ベクター約２μｇを制限酵素で線状化し、Ｂｉｏ－Ｒａｄ　ｅｌｅｃｔｒｏｐｈｏｒｅｔｅｒをもちいて３５０Ｖ、５００μＦの条件で、４×１０$^{6}$個のＣＨＯ細胞に遺伝子を導入し、９６ｗｅｌｌ　ｃｕｌｔｕｒｅ　ｐｌａｔｅに播種した。リポフェクションは、ＬｉｐｏｆｅｃｔＡＭＩＮＥ　Ｐｌｕｓ（ギブコ・ビーアールエル社製）を用いてマニュアルに従って実施した。ベクターの導入処理後、発現ベクターの選択マーカーに対応した薬剤を添加して培養を継続した。コロニーを確認した後、実施例４に示した方法によって、抗体発現株を選別した。選別した細胞からの抗体精製は、実施例８にしたがって行った。

実施例１５　細胞傷害性活性の検討

抗体を介した細胞傷害性活性は、ＮＫ細胞或いは好中球などのキラー活性を有する細胞と抗体の存在下でターゲット細胞への傷害活性（抗体依存性細胞性細胞傷害活性（Ａｎｔｉｂｏｄｙ－Ｄｅｐｅｎｄｅｎｔ　Ｃｅｌｌｕｌａｒ　Ｃｙｔｏｔｏｘｉｃｉｔｙ）、以下、ＡＤＣＣ）、及び補体と抗体の存在下でターゲット細胞への傷害活性（補体依存性細胞傷害活性（Ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔ－Ｄｅｐｅｎｄｅｎｔ　Ｃｙｔｏｔｏｘｉｃｉｔｙ）以下、ＣＤＣ）の測定を実施した。抗体は、実施例８で作成したハイブリドーマ由来ＨＤ４及びＨＤ８、実施例１４で作成した各ＣＨＯ細胞由来の組換え抗体を使用した。この際、コントロールとしてｈＩｇＧを用いた。

方法は簡単には、ターゲット細胞に放射性クロム（Ｃｒ$^{51}$）を細胞質内に取り込ませ、細胞死により培養液中に遊離されるＣｒ$^{51}$量をγ線量で測定した。

具体的には、ターゲット細胞としてバーキットリンパ腫細胞株Ｒａｊｉ（ＡＴＣＣ　ＣＣＬ－８６）を１０$^{6}$個を１５μＬのＦｅｔａｌ　Ｃａｌｆ　Ｓｅｒｕｍ（ＦＣＳ）に懸濁し、５０μＬ（３７ＭＢｑ／ｍＬ）のＣｒ$^{51}$ラベルされたクロム酸ナトリウム（パーキエルマー社製：以下Ｃｒ$^{51}$と書く）を添加し、１時間３７℃で培養した。次に、培地を１０ｍＬ添加し、遠心して培地を捨てることを３回繰り返すことで、細胞内に取り込まれ

ていないＣｒ$^{51}$を除いた。

ＡＤＣＣアッセイは、Ｃｒ$^{51}$ラベルしたターゲット細胞２０００個に対して、実施例６記載の方法で取得した健常人末梢血単核球２０００００個を、丸底９６ウェルプレート（Ｆａｌｃｏｎ社製）中で全体容量２００μＬで、各抗体濃度とともに３７℃、５％ＣＯ$_2$存在下で４時間培養した。

ＣＤＣアッセイは、Ｃｒ$^{51}$ラベルしたターゲット細胞２０００個に対して、最終濃度５％のヒト血清由来補体（ＳＩＧＭＡ社製）を、丸底９６ウェルプレート中で全体容量２００μＬで、各抗体濃度とともに３７℃、５％ＣＯ$_2$存在下で２時間培養した。

ＡＤＣＣ・ＣＤＣアッセイともに培養後、プレートを遠心して細胞を沈めた後、上清５０μＬを粉末シンチレーター含有の９６穴プレート（Ｌｕｍａｐｌａｔｅ$^{TM}$－９６：パッカード社製）に移し、５５℃、１．５時間で乾燥した。乾燥を確認後、専用カバー（ＴｏｐＳｅａｌ$^{TM}$－Ａ：９６－ｗｅｌｌ　Ｍｉｃｒｏｐｌａｔｅｓ：パッカード社製）でプレートをカバーし、シンチレーションカウンター（トップカウント：パッカード社製）でγ線量を測定した。

その結果を図３、表３に示す。ＣＤＣ活性については、ＨＤ８ＩｇＧ１Ｓｅｒ、ＨＤ８ＩｇＧ２Ｓｅｒ、ＨＤ８ＩｇＧ４、ＨＤ４Ｇ２Ｓｅｒ、ＨＤ４Ｇ４は活性が無く、ＨＤ８ＩｇＧ１、ＨＤ８ＩｇＧ２、ＨＤ４Ｇ１では活性を有していることを確認した。またＡＤＣＣ活性は、ＨＤ８ＩｇＧ１、ＨＤ８ＩｇＧ１Ｓｅｒ、ＨＤ４Ｇ１のみ活性を有していることを確認した。

実施例１６　マウス担癌モデルに対する組換え型抗体の効果

実施例１１と同様のモデルを使用し、ＨＤ８組換え型抗体のマウス担癌モデルを用いた薬理作用を検討した。

まず５週令のＣ．Ｂ－１７／ＩＣＲ－ＳＣＩＤマウス（日本クレア（株）社製）を購入し、６週齢時に抗アシアロＧＭ１抗血清（和光化学社製）を１０μＬ／マウス個体で希釈して静脈内投与した。翌日、バーキットリンパ腫細胞Ｒａｊｉ（ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＣＬ－８６）を５×１０$^{6}$／マウス個体で静脈内投与した。Ｒａｊｉ移植より３日後、マウスの尾静脈内に各
抗体を0.1或いは１⌠g/マウス個体の用量で１回投与した。移植後の生存数を観察した。

実施例１４で作成したＨＤ８Ｇ１Ｓｅｒ及びＨＤ８Ｇ２Ｓｅｒについては０．１、１μｇ／マウス個体の用量で１回投与した。抗体の陰性コントロールとして実施例９で陰性コントロールとして使用したｈＩｇＧ抗体を１μｇ／ｈｅａｄの用量で投与した群を、陽性コントロールとしてＨＤ８Ｇ１を１μｇ／マウス個体の用量で投与した群を設けた。

以上の実験の結果を図４に示す。陰性コントロールであるｈＩｇＧ投与群では、Ｒａｊｉ移植後１６日以内に全例死亡した。２０日後の生存数は、１μｇ／マウス個体においてはｈＩｇＧ群以外６匹全例生存し（図４Ａ）、０．１μｇ／マウス個体においてはＨＤ８Ｇ２Ｓｅｒ群では６匹全例、ＨＤ８Ｇ１Ｓｅｒ群では２例生存していた（図４Ｂ）。２５日後の生存数は、１μｇ／マウス個体においてはＨＤ８Ｇ１Ｓｅｒ群は２匹、ＨＤ８Ｇ１は１匹、ＨＤ８Ｇ２Ｓｅｒ群は４匹生存し（図４Ａ）、０．１μｇ／マウス個体においてはＨＤ８Ｇ２Ｓｅｒ群のみ１匹生存していた（図４Ｂ）。

この結果、ＨＤ８組換え抗体であるＨＤ８Ｇ１Ｓｅｒ及びＨＤ８Ｇ２Ｓｅｒにおいても、ＨＤ８と同様に非常に低用量で抗腫瘍効果を発揮することが判明した。ＨＤ８Ｇ２ＳｅｒはＡＤＣＣ・ＣＤＣ両方の活性がないにもかかわらず、動物モデルにおいて薬効を示すことが判った。

実施例１７　ＨＤ４、ＨＤ６及びＨＤ８のエピトープ解析

定法に従ってウェスタン解析を実施することで、各抗体のエピトープ解析を実施した。簡単には、セルロース或いはＰＶＤＦ膜はブロックエース（雪印社製）などでブロッキング後、各抗体を１次抗体として１μｇ／ｍＬの濃度で、二次抗体としてＨＲＰ　ｃｏｎｊｕｇａｔｅｄ　ａｎｔｉ　ｒａｂｂｉｔ　ＩｇＧ（ＤＡＫＯ社製）を用いて０．５μｇ／ｍＬの濃度で反応させ、ＨＲＰ標識抗ヒト抗体（例：ＤＡＫＯ社製）と反応させ、化学発光

試薬（例：ＥＣＬウェスタンブロッティング検出試薬：アマシャムバイオサイエンス社）を用いて、化学発光検出装置（例：ＬＡＳ－１０００：富士フィルム社製）で化学発光を検出した。
（１）ＨＬＡ－ＤＲを発現しているリンパ腫細胞株ＳＫＷ６．４（ＡＴＣＣ　ＴＩＢ－２１５）より膜画分を抽出し、抗ＨＬＡ－ＤＲ抗体（Ｋ２８Ｎ：産生細胞名マウス－マウスハイブリドーマＫ２８：受託番号ＦＥＲＭ　ＢＰ－４５７７で１９９４年2月２２日に独立行政法人　産業技術総合研究所　特許生物寄託センターに国際寄託されている）のアフィニティーカラムを用いてＨＬＡ－ＤＲタンパクを精製した。取得したタンパクを４／２０グラジエントゲル（第一化学薬品製）を用いて非還元条件で煮沸（９５℃、５分）し、ゲル１枚あたり２５ｍＡの定電流で１．５ｈｒ泳動後、ＰＶＤＦ膜にゲル１枚あたり１５０ｍＡの定電流で１ｈｒ転写した。次いで定法に従ってウェスタン解析を行った結果、ＨＤ４、ＨＤ６、ＨＤ８はすべて約３０Ｋｄａの位置にあるＨＬＡ－ＤＲβ鎖を認識していることが判明した。
（２）次に、ＨＬＡ－ＤＲのβ鎖（ＤＲＢ１＊１５０１１）の細胞外領域１９９アミノ酸（配列番号１４７に示すアミノ酸配列のうち第２９番目から第２２７番目の１９９アミノ酸、配列番号１４６には配列番号１４７に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す）について、１３－ｍｅｒペプチドを２アミノ酸ずつずらして合計９４種のペプチド（配列番号５２から１４５）をセルロース膜上にＣ末端からスポット状に合成し、Ｎ末をアセチル化した（ＪＥＲＩＮＩ社：ドイツ）。以降の反応は定法のウェスタン解析（Ｒｅｉｎｅｋｅ，Ｕ．ほか．（２００１）．“Ｅｐｉｔｏｐｅ　ｍａｐｐｉｎｇ　ｗｉｔｈ　ｓｙｎｔｈｅｔｉｃ　ｐｅｐｔｉｄｅｓ　ｐｒｅｐａｒｅｄ　ｂｙ　ＳＰＯＴ　ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ．”Ａｎｔｉｂｏｄｙ　Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ（Ｓｐｒｉｎｇｅｒ　Ｌａｂ　Ｍａｎｕａｌ）Ｅｄｓ．：Ｋｏｎｔｅｒｍａｎｎ／Ｄｕｂｅｌ，４３３－４５９．など参照）を元に実施した。解析はＬｕｍｉｌｍａｇｅｒＴＭ（Ｂｏｅｈｒｉｎｇｅｒ－Ｍａｎｎｈｅｉｍ社）を使用し、各スポットの発色強度を数値化した。
その結果を図５に示す。ＨＤ４（図５Ａ）はアミノ酸６１番目～７３番目に強い反応、１７番目～２９番目、６３番目～７５番目、６５番目～７７番目に弱い反応を示し、配列番号８３で示されるアミノ酸配列を有するペプチドと最も強力に結合した。ＨＤ６（図５Ｂ）は６１番目～７３番目に強い反応、５７番目～６９番目、５９番目～７１番目に弱い反応を示し、配列番号８３で示されるアミノ酸配列を有するペプチドと最も強力に結合した。ＨＤ８（図５Ｃ）は６１番目～７３番目、６３番目～７５番目、６５番目～７７番目に非常に強い反応を示し、配列番号８２、８３及び８４で示されるアミノ酸配列を有するペプチドの少なくとも一つと強力に結合した。一方、ＨＬＡ－ＤＲの立体構造（例：Ｄｅｓｓｅｎ　Ａ　ｅｔ．Ａｌ．，Ｉｍｍｕｎｉｔｙ（１９９７），７，４７３－４８１参照）より、６１番目～７３番目のアミノ酸は抗原提示するペプチドを保持する部位で、αヘリックスを構成していることが判明している。
（３）ＨＤ４・ＨＤ６・ＨＤ８に共通して最も強い反応を示す１３アミノ酸（６１番目～７３番目）について、β鎖の多型を考慮し、現在知られている多型約３５０種類（ＥＭＢＬ－ＥＢＩのＩＭＧＴ／ＨＬＡデータベースなど参照）のほぼ全部を含む１６種類のペプチドを作成した。さらに各アミノ酸のアラニン（もともとアラニンの場合グアニジン）置換した１２ペプチド（配列番号４０～配列番号５１）について、同様の条件でウェスタンブロッティングを実施した。解析は、ＬＡＳ２０００及び解析ソフトＩｍａｇｅＧａｕｇｅ（富士写真フィルム株式会社）を使用して、各スポットの発色強度を数値化した。図６に２８種類のペプチドの配列とＨＤ４、ＨＤ６及びＨＤ８との反応性を示す。各抗体が陽性反応を示した配列にはその強さに応じて＋～＋＋＋＋、陰性の場合は－で表示した。
陽性、陰性の判定は、以下の基準で行った。
バックグラウンドの５％未満：－
バックグラウンドの５％以上１０％未満：＋／－
バックグラウンドの１０％以上２０％未満：＋
バックグラウンドの２０％以上３０％未満：＋＋

バックグラウンドの３０％以上５０％未満：＋＋＋
バックグラウンドの５０％以上：＋＋＋＋
ＨＤ８は、６５、６６、６９、７２番目のアミノ酸をアラニン置換した配列番号４８～５１以外にはすべて陽性反応を示した。６５，６６，６９，７２番目のアミノ酸は発見されているＨＬＡ－ＤＲβ鎖のほぼすべてのＨＬＡ－ＤＲのβ鎖において保存されている（ＥＭＢＬ－ＥＢＩのＩＭＧＴ／ＨＬＡデータベースなど参照）。さらに配列番号２４～３９でメジャーな配列を含むほとんどのＨＬＡ－ＤＲβ鎖配列を網羅していることから、ＨＤ８は実質的にほぼすべてのＨＬＡ－ＤＲβ鎖に結合するＰａｎ－ＨＬＡ－ＤＲ抗体である可能性が非常に高い。
さらに、ＨＬＡ－ＤＲ陽性細胞株を用いて実施例１０と同様の方法でＨＤ８の反応性を検討したところ、ＡＲＨ７７（ＡＴＣＣ　ＣＲＬ－１６２１）、Ｄａｕｄｉ（ＡＴＣＣ　ＣＣＬ－２１３）、ＨＳ－Ｓｕｌｔａｎ（ＡＴＣＣ　ＣＲＬ－１４８４）、ＩＭ－９（ＡＴＣＣ　ＣＣＬ－１５９）、ＭＣ／ＣＡＲ（ＡＴＣＣ　ＣＲＬ－８０８３）、Ｒａｊｉ（ＡＴＣＣ　ＣＣＬ－８６）、Ｒａｍｏｓ（ＡＴＣＣ　ＣＲＬ－１５９６）、ＲＬ（ＡＴＣＣ　ＣＲＬ－２２６１）、ＳＫＷ６．４（ＡＴＣＣ　ＴＩＢ－２１５）、ＤＲＢ１＊１５０１１／ＤＲＡ＊０１０１を強制発現させたＬ細胞（Ｌ細胞：ＡＴＣＣ　ＣＣＬ－１）、ヒト健常日本人の末梢血単核球５検体と反応することも確認しており、反応しないＨＬＡ－ＤＲを発現している細胞には、現在のところ発見できていない。さらにカニクイザルにおいても１５検体中１５検体、チンパンジーは１検体中１検体に反応している。一方、Ｂ細胞系細胞株でＨＬＡ－ＤＲを発現していないＲＰＭＩ８２２６（ＡＴＣＣ　ＣＣＬ－１５５）には反応しなかった。
産業上の利用性
本発明により、ＨＬＡ－ＤＲを発現している細胞に起因する疾患に対する予防又は治療剤、特に悪性腫瘍治療薬としてほぼすべてのＨＬＡ－ＤＲ多型を有する患者に有用である分子が提供された。
さらに、ＨＬＡ－ＤＲが関与する免疫活性を抑制することによる免疫抑制薬、特にリウマチ治療薬として有用である分子が提供された。
本明細書に引用されたすべての刊行物は、その内容の全体を本明細書に取り込むものとする。また、添付の請求の範囲に記載される技術思想及び発明の範囲を逸脱しない範囲内で本発明の種々の変形及び変更が可能であることは当業者には容易に理解されるであろう。本発明はこのような変形及び変更をも包含することを意図している。
【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> KIRIN BEER KABUSHIKI KAISHA

<120> Anti HLA-DR antibody

<130> PH-1646-PCT

<140>
<141>

<150>JP2001/317054
<151>2001-10-15

<160> 147

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 1
ccggaattcc caccatggcc ataagtggag tccctgtg 38

<210> 2
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 2
aaagcggccg ctcattacag aggccccctg cgttctgc 38

<210> 3
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 3
ccggaattcc tggtcctgtc ctgttctcca gca 33

<210> 4
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

〈220〉
〈223〉 Description of Artificial Sequence:primer

〈400〉 4
aaagcggccg ctcatcagct caggaatcct gttggctg 38

〈210〉 5
〈211〉 27
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉
〈223〉 Description of Artificial Sequence:primer

〈400〉 5
ggtccgggag atcatgaggg tgtcctt 27

〈210〉 6
〈211〉 26
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉
〈223〉 Description of Artificial Sequence:primer

〈400〉 6

gtgcacgccg ctggtcaggg cgcctg 26

<210> 7
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 7
ggtgccaggg ggaagaccga tgg 23

<210> 8
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 8
atatgtcgac ccagccctgg gattttcagg tgttttc 37

<210> 9
<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 9

atatgtcgac tggctgacca gggcagtcac cagag 35

<210> 10

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 10

gatgggccct tggtgctagc tgaggagacg g 31

<210> 11

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 11
gttgaagctc tttgtgacgg gcgagc 26

<210> 12
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 12
tggcgggaag atgaagacag atggtg 26

<210> 13
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 13
atatagatct gctgctcagt taggacccag agggaacc 38

<210> 14
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 14
atatagatct gggagtcaga cccactcagg acacagc 37

<210> 15
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 15
aagacagatg gtgcagccac cgtacgtttg at 32

<210> 16
<211> 510
<212> DNA
<213> Homo sapiens

〈400〉 16

gtcgacccag ccctgggatt ttcaggtgtt ttcaggtgtt ttcatttggt gatcaggact 60
gaacagagag aactcaccat ggagtttggg ctgagctggc tttttcttgt ggctatttta 120
aaaggtgtcc agtgtgaggt gcaactgttg gagtctgggg gaggcttggt acagcctggg 180
gggtccctga gactctcctg tgcagcctct ggattcacct ttagcagcta tgccatgacc 240
tgggtccgcc aggctccagg gaaggggctg gagtgggtct caggtattag tggtggtggt 300
gatagcacat actacgcaga ctccgtgaag ggccggttca ccatctccag agacaattcc 360
aagaacacgc tgtatctgca aatgaacagc ctgagagccg aggacacggc cgtatattac 420
tgtgcgagag atcatggttc ggggagttat tatccctact ggtttgacta ctggggccag 480
ggaaccctgg tcaccgtctc ctcagctagc 510

〈210〉 17
〈211〉 143
〈212〉 PRT
〈213〉 Homo sapiens

〈400〉 17

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Ser Ser Tyr Ala Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ser Gly Ile Ser Gly Gly Gly Asp Ser Thr Tyr Tyr Ala
65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp His Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Pro Tyr Trp
115 120 125

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
130 135 140

<210> 18
<211> 424
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 18
agatctgctg ctcagttagg acccagaggg aaccatggaa accccagcgc agcttctctt 60
cctcctgcta ctctggctcc cagataccac cggagaactt gtgttgacgc agtctccagg 120
caccctgtct ttgtctccag gggaaagagc caccctctcc tgcagggcca gtcagagtgt 180
tagcagccgc tacttagcct ggtaccagca gaaacctggc caggctccca ggctcctcat 240
ctatggtgca tccagcaggg ccactggcat cccagacagg ttcagtggca gtgggtctgg 300
gacagacttc actctcacca tcagcagact ggagcctgaa gattttgcag tgtattactg 360

tcagcagtat ggtagctcac cgctcacttt cggcggaggg accaaggtgg agatcaaacg 420

tacg 424

<210> 19

<211> 130

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Glu Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser
20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
35 40 45

Val Ser Ser Arg Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
50 55 60

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro
65 70 75 80

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
85 90 95

Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr

100 105 110

Gly Ser Ser Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
115 120 125

Arg Thr
130

<210> 20
<211> 502
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 20
gtcgactggc tgaccagggc agtcaccaga gctccagaca atgtctgtct ccttcctcat 60
cttcctgccc gtgctgggcc tcccatgggg tgtcctgtca caggttcagc tgcagcactc 120
aggtccagga ctggtgaagc cctcgcagac cctctcactc acctgtgcca tctccgggga 180
cagtgtctct agcaacagtg cttcttggaa ctggatcagg cagtccccat cgaggggcct 240
tgagtggctg ggaaggacat actacaggtc caagtggtat aatgattatg cagtatctgt 300
gaaaagtcga atagtcatca acccagacac atccaagaac cagttctccc tgcagctgaa 360
ctctgtgact cccgaggaca cggctgtgta ttactgtgcg agagaaaatt tctatggttc 420
ggagacttgt cataagaagt attactgcta cggtatggac gtctggggcc aagggaccac 480
ggtcaccgtc tcctcagcta gc 502

<210> 21
<211> 154
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

Met Ser Val Ser Phe Leu Ile Phe Leu Pro Val Leu Gly Leu Pro Trp
1 5 10 15

Gly Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln His Ser Gly Pro Gly Leu Val
20 25 30

Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser
35 40 45

Val Ser Ser Asn Ser Ala Ser Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser
50 55 60

Arg Gly Leu Glu Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr
65 70 75 80

Asn Asp Tyr Ala Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Val Ile Asn Pro Asp
85 90 95

Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu
100 105 110

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Asn Phe Tyr Gly Ser Glu
115 120 125

Thr Cys His Lys Lys Tyr Tyr Cys Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln
130 135 140

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
145 150

<210> 22
<211> 426
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 22
agatctggga gtcagaccca ctcaggacac agcatggaca tgagggtccc cgctcagctc 60
ctggggcttc tgctgctctg gctcccaggt gccagatgtg ccatccagtt gacccagtct 120
ccatcctccc tgtctgcatc tgtaggagac agagtcacca tcacttgccg ggcaagtcag 180
ggcattagca gtgctttagc ctggtatcag cagaaaccag ggaaagctcc taaactcctg 240
atctatgatg cctccagttt ggaaagtggg gtcccatcaa ggttcagcgg cagtggatct 300
gggacagatt tcactctcac catcagcagc ctgcagcctg aagattttgc aacttattac 360
tgtcaacagt ttaatagttt cccgctcact ttcggcggag ggaccaaggt ggagatcaaa 420
cgtacg 426

<210> 23
<211> 132
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 23
Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Pro Gly Ala Arg Cys Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser
20 25 30

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
35 40 45

Gln Gly Ile Ser Ser Ala Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
50 55 60

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val
65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
85 90 95

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
100 105 110

Phe Asn Ser Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
115 120 125

Lys Arg Thr Val
130

<210> 24
<211> 13
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 24

Trp Asn Ser Gln Lys Asp Phe Leu Glu Asp Arg Arg Ala
1 5 10

<210> 25

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 25

Trp Asn Ser Gln Lys Asp Phe Leu Glu Arg Arg Arg Ala
1 5 10

<210> 26

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 26

Trp Asn Ser Gln Lys Asp Phe Leu Glu Asp Glu Arg Ala

1 5 10

<210> 27

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 27

Trp Asn Ser Gln Lys Asp Phe Leu Glu Gln Ala Arg Ala

1 5 10

<210> 28

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 28

Trp Asn Ser Gln Lys Asp Ile Leu Glu Asp Glu Arg Ala
1 5 10

<210> 29
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 29
Trp Asn Ser Gln Lys Asp Ile Leu Glu Gln Lys Arg Gly
1 5 10

<210> 30
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 30
Trp Asn Ser Gln Lys Asp Ile Leu Glu Asp Arg Arg Ala
1 5 10

<210> 31

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 31

Trp Asn Ser Gln Lys Asp Ile Leu Glu Asp Arg Arg Gly
1 5 10

<210> 32

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 32

Trp Asn Ser Gln Lys Asp Ile Leu Glu Asp Lys Arg Ala
1 5 10

<210> 33

<211> 13

〈212〉 PRT

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 Description of Artificial Sequence:peptide

〈400〉 33

Trp Asn Ser Gln Lys Asp Ile Leu Glu Gln Ala Arg Ala

1 5 10

〈210〉 34

〈211〉 13

〈212〉 PRT

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 Description of Artificial Sequence:peptide

〈400〉 34

Trp Asn Ser Gln Lys Asp Leu Leu Glu Gln Arg Arg Ala

1 5 10

〈210〉 35

〈211〉 13

〈212〉 PRT

〈213〉 Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 35

Trp Asn Ser Gln Lys Asp Leu Leu Glu Gln Ala Arg Ala
 1 5 10

<210> 36

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 36

Trp Asn Ser Gln Lys Asp Leu Leu Glu Gln Lys Arg Gly
 1 5 10

<210> 37

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 37

Trp Asn Ser Gln Lys Asp Leu Leu Glu Asp Arg Arg Ala

1 5 10

<210> 38

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 38

Trp Asn Ser Gln Lys Asp Leu Leu Glu Arg Arg Arg Ala

1 5 10

<210> 39

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 39

Trp Asn Ser Gln Lys Asp Leu Leu Glu Asp Glu Arg Ala

1 5 10

<210> 40
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 40
Trp Asn Ser Gln Lys Asp Ala Leu Glu Gln Arg Arg Ala
1 5 10

<210> 41
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 41
Trp Asn Ser Gln Lys Asp Leu Leu Glu Ala Arg Arg Ala
1 5 10

<210> 42

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 42

Trp Asn Ser Gln Lys Asp Leu Leu Glu Gln Ala Arg Ala
1 5 10

<210> 43

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 43

Trp Asn Ser Gln Lys Asp Leu Leu Glu Gln Arg Arg Gly
1 5 10

<210> 44

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 44

Ala Asn Ser Gln Lys Asp Leu Leu Glu Gln Arg Arg Ala
1 5 10

<210> 45

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 45

Trp Ala Ser Gln Lys Asp Leu Leu Glu Gln Arg Arg Ala
1 5 10

<210> 46

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 46

Trp Asn Ala Gln Lys Asp Leu Leu Glu Gln Arg Arg Ala
1 5 10

<210> 47
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 47

Trp Asn Ser Ala Lys Asp Leu Leu Glu Gln Arg Arg Ala
1 5 10

<210> 48
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 48

Trp Asn Ser Gln Ala Asp Leu Leu Glu Gln Arg Arg Ala

1 5 10

<210> 49

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 49

Trp Asn Ser Gln Lys Ala Leu Leu Glu Gln Arg Arg Ala

1 5 10

<210> 50

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 50

Trp Asn Ser Gln Lys Asp Leu Leu Ala Gln Arg Arg Ala

1 5 10

<210> 51
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 51
Trp Asn Ser Gln Lys Asp Leu Leu Glu Gln Arg Ala Ala
1 5 10

<210> 52
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 52
Gly Asp Thr Arg Pro Arg Phe Leu Trp Gln Pro Lys Arg
1 5 10

<210> 53
<211> 13
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 53

Thr Arg Pro Arg Phe Leu Trp Gln Pro Lys Arg Glu Cys
1 5 10

<210> 54

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 54

Pro Arg Phe Leu Trp Gln Pro Lys Arg Glu Cys His Phe
1 5 10

<210> 55

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 55

Phe Leu Trp Gln Pro Lys Arg Glu Cys His Phe Phe Asn

1 5 10

<210> 56

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 56

Trp Gln Pro Lys Arg Glu Cys His Phe Phe Asn Gly Thr

1 5 10

<210> 57

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 57

Pro Lys Arg Glu Cys His Phe Phe Asn Gly Thr Glu Arg
1 5 10

<210> 58
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 58
Arg Glu Cys His Phe Phe Asn Gly Thr Glu Arg Val Arg
1 5 10

<210> 59
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 59
Cys His Phe Phe Asn Gly Thr Glu Arg Val Arg Phe Leu
1 5 10

<210> 60
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 60
Phe Phe Asn Gly Thr Glu Arg Val Arg Phe Leu Asp Arg
1 5 10

<210> 61
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 61
Asn Gly Thr Glu Arg Val Arg Phe Leu Asp Arg Tyr Phe
1 5 10

<210> 62
<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 62

Thr Glu Arg Val Arg Phe Leu Asp Arg Tyr Phe Tyr Asn

1 5 10

<210> 63

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 63

Arg Val Arg Phe Leu Asp Arg Tyr Phe Tyr Asn Gln Glu

1 5 10

<210> 64

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 64

Arg Phe Leu Asp Arg Tyr Phe Tyr Asn Gln Glu Glu Ser
1 5 10

<210> 65

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 65

Leu Asp Arg Tyr Phe Tyr Asn Gln Glu Glu Ser Val Arg
1 5 10

<210> 66

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 66

Arg Tyr Phe Tyr Asn Gln Glu Glu Ser Val Arg Phe Asp
1 5 10

<210> 67
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 67

Phe Tyr Asn Gln Glu Glu Ser Val Arg Phe Asp Ser Asp
1 5 10

<210> 68
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 68

Asn Gln Glu Glu Ser Val Arg Phe Asp Ser Asp Val Gly
1 5 10

〈210〉 69

〈211〉 13

〈212〉 PRT

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 Description of Artificial Sequence:peptide

〈400〉 69

Glu Glu Ser Val Arg Phe Asp Ser Asp Val Gly Glu Phe
1               5                   10

〈210〉 70

〈211〉 13

〈212〉 PRT

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 Description of Artificial Sequence:peptide

〈400〉 70

Ser Val Arg Phe Asp Ser Asp Val Gly Glu Phe Arg Ala
1               5                   10

〈210〉 71

〈211〉 13

〈212〉 PRT

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 Description of Artificial Sequence:peptide

〈400〉 71

Arg Phe Asp Ser Asp Val Gly Glu Phe Arg Ala Val Thr

1 5 10

〈210〉 72

〈211〉 13

〈212〉 PRT

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 Description of Artificial Sequence:peptide

〈400〉 72

Asp Ser Asp Val Gly Glu Phe Arg Ala Val Thr Glu Leu

1 5 10

〈210〉 73

〈211〉 13

〈212〉 PRT

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 Description of Artificial Sequence:peptide

〈400〉 73

Asp Val Gly Glu Phe Arg Ala Val Thr Glu Leu Gly Arg
1 5 10

〈210〉 74

〈211〉 13

〈212〉 PRT

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 Description of Artificial Sequence:peptide

〈400〉 74

Gly Glu Phe Arg Ala Val Thr Glu Leu Gly Arg Pro Asp
1 5 10

〈210〉 75

〈211〉 13

〈212〉 PRT

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 75

Phe Arg Ala Val Thr Glu Leu Gly Arg Pro Asp Ala Glu

1 5 10

<210> 76

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 76

Ala Val Thr Glu Leu Gly Arg Pro Asp Ala Glu Tyr Trp

1 5 10

<210> 77

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 77

Thr Glu Leu Gly Arg Pro Asp Ala Glu Tyr Trp Asn Ser

1 5 10

<210> 78
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 78
Leu Gly Arg Pro Asp Ala Glu Tyr Trp Asn Ser Gln Lys
1 5 10

<210> 79
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 79
Arg Pro Asp Ala Glu Tyr Trp Asn Ser Gln Lys Asp Ile
1 5 10

<210> 80
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 80
Asp Ala Glu Tyr Trp Asn Ser Gln Lys Asp Ile Leu Glu
1 5 10

<210> 81
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 81
Glu Tyr Trp Asn Ser Gln Lys Asp Ile Leu Glu Gln Ala
1 5 10

<210> 82
<211> 13
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 82

Trp Asn Ser Gln Lys Asp Ile Leu Glu Gln Ala Arg Ala
1 5 10

<210> 83

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 83

Ser Gln Lys Asp Ile Leu Glu Gln Ala Arg Ala Ala Val
1 5 10

<210> 84

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 84

Lys Asp Ile Leu Glu Gln Ala Arg Ala Ala Val Asp Thr
1 5 10

<210> 85

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 85

Ile Leu Glu Gln Ala Arg Ala Ala Val Asp Thr Tyr Cys
1 5 10

<210> 86

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 86

Glu Gln Ala Arg Ala Ala Val Asp Thr Tyr Cys Arg His
1 5 10

〈210〉 87
〈211〉 13
〈212〉 PRT
〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉
〈223〉 Description of Artificial Sequence:peptide

〈400〉 87
Ala Arg Ala Ala Val Asp Thr Tyr Cys Arg His Asn Tyr
1 5 10

〈210〉 88
〈211〉 13
〈212〉 PRT
〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉
〈223〉 Description of Artificial Sequence:peptide

〈400〉 88
Ala Ala Val Asp Thr Tyr Cys Arg His Asn Tyr Gly Val
1 5 10

<210> 89

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 89

Val Asp Thr Tyr Cys Arg His Asn Tyr Gly Val Val Glu

1 5 10

<210> 90

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 90

Thr Tyr Cys Arg His Asn Tyr Gly Val Val Glu Ser Phe

1 5 10

<210> 91

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 91

Cys Arg His Asn Tyr Gly Val Val Glu Ser Phe Thr Val

1 5 10

<210> 92

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 92

His Asn Tyr Gly Val Val Glu Ser Phe Thr Val Gln Arg

1 5 10

<210> 93

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 93

Tyr Gly Val Val Glu Ser Phe Thr Val Gln Arg Arg Val

1 5 10

<210> 94

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 94

Val Val Glu Ser Phe Thr Val Gln Arg Arg Val Gln Pro

1 5 10

<210> 95

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 95

Glu Ser Phe Thr Val Gln Arg Arg Val Gln Pro Lys Val
1 5 10

<210> 96
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 96

Phe Thr Val Gln Arg Arg Val Gln Pro Lys Val Thr Val
1 5 10

<210> 97
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 97

Val Gln Arg Arg Val Gln Pro Lys Val Thr Val Tyr Pro
1 5 10

〈210〉 98

〈211〉 13

〈212〉 PRT

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 Description of Artificial Sequence:peptide

〈400〉 98

Arg Arg Val Gln Pro Lys Val Thr Val Tyr Pro Ser Lys

1 5 10

〈210〉 99

〈211〉 13

〈212〉 PRT

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 Description of Artificial Sequence:peptide

〈400〉 99

Val Gln Pro Lys Val Thr Val Tyr Pro Ser Lys Thr Gln

1 5 10

〈210〉 100

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 100

Pro Lys Val Thr Val Tyr Pro Ser Lys Thr Gln Pro Leu
1 5 10

<210> 101

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 101

Val Thr Val Tyr Pro Ser Lys Thr Gln Pro Leu Gln His
1 5 10

<210> 102

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 102

Val Tyr Pro Ser Lys Thr Gln Pro Leu Gln His His Asn
1 5 10

<210> 103

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 103

Pro Ser Lys Thr Gln Pro Leu Gln His His Asn Leu Leu
1 5 10

<210> 104

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 104

Lys Thr Gln Pro Leu Gln His His Asn Leu Leu Val Cys
1 5 10

<210> 105

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 105

Gln Pro Leu Gln His His Asn Leu Leu Val Cys Ser Val
1 5 10

<210> 106

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 106

Leu Gln His His Asn Leu Leu Val Cys Ser Val Ser Gly

1 5 10

<210> 107

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 107

His His Asn Leu Leu Val Cys Ser Val Ser Gly Phe Tyr

1 5 10

<210> 108

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 108

Asn Leu Leu Val Cys Ser Val Ser Gly Phe Tyr Pro Gly

1 5 10

〈210〉 109

〈211〉 13

〈212〉 PRT

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 Description of Artificial Sequence:peptide

〈400〉 109

Leu Val Cys Ser Val Ser Gly Phe Tyr Pro Gly Ser Ile

1 5 10

〈210〉 110

〈211〉 13

〈212〉 PRT

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 Description of Artificial Sequence:peptide

〈400〉 110

Cys Ser Val Ser Gly Phe Tyr Pro Gly Ser Ile Glu Val

1 5 10

〈210〉 111

〈211〉 13

〈212〉 PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 111

Val Ser Gly Phe Tyr Pro Gly Ser Ile Glu Val Arg Trp
1 5 10

<210> 112

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 112

Gly Phe Tyr Pro Gly Ser Ile Glu Val Arg Trp Phe Leu
1 5 10

<210> 113

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 113

Tyr Pro Gly Ser Ile Glu Val Arg Trp Phc Leu Asn Gly

1 5 10

<210> 114

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 114

Gly Ser Ile Glu Val Arg Trp Phe Leu Asn Gly Gln Glu

1 5 10

<210> 115

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 115

Ile Glu Val Arg Trp Phe Leu Asn Gly Gln Glu Glu Lys
1 5 10

<210> 116
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 116
Val Arg Trp Phe Leu Asn Gly Gln Glu Glu Lys Ala Gly
1 5 10

<210> 117
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 117
Trp Phe Leu Asn Gly Gln Glu Glu Lys Ala Gly Met Val
1 5 10

<210> 118

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 118

Leu Asn Gly Gln Glu Glu Lys Ala Gly Met Val Ser Thr
1 5 10

<210> 119

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 119

Gly Gln Glu Glu Lys Ala Gly Met Val Ser Thr Gly Leu
1 5 10

<210> 120

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 120

Glu Glu Lys Ala Gly Met Val Ser Thr Gly Leu Ile Gln

1 5 10

<210> 121

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 121

Lys Ala Gly Met Val Ser Thr Gly Leu Ile Gln Asn Gly

1 5 10

<210> 122

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 122

Gly Met Val Ser Thr Gly Leu Ile Gln Asn Gly Asp Trp
1 5 10

<210> 123

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 123

Val Ser Thr Gly Leu Ile Gln Asn Gly Asp Trp Thr Phe
1 5 10

<210> 124

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 124

Thr Gly Leu Ile Gln Asn Gly Asp Trp Thr Phe Gln Thr
1 5 10

<210> 125
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 125

Leu Ile Gln Asn Gly Asp Trp Thr Phe Gln Thr Leu Val
1 5 10

<210> 126
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 126

Gln Asn Gly Asp Trp Thr Phe Gln Thr Leu Val Met Leu
1 5 10

<210> 127

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 127

Gly Asp Trp Thr Phe Gln Thr Leu Val Met Leu Glu Thr

1 5 10

<210> 128

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 128

Trp Thr Phe Gln Thr Leu Val Met Leu Glu Thr Val Pro

1 5 10

<210> 129

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 129

Phe Gln Thr Leu Val Met Leu Glu Thr Val Pro Arg Ser
1 5 10

<210> 130

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 130

Thr Leu Val Met Leu Glu Thr Val Pro Arg Ser Gly Glu
1 5 10

<210> 131

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 131

Val Met Leu Glu Thr Val Pro Arg Ser Gly Glu Val Tyr
1 5 10

<210> 132

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 132

Leu Glu Thr Val Pro Arg Ser Gly Glu Val Tyr Thr Cys
1 5 10

<210> 133

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 133

Thr Val Pro Arg Ser Gly Glu Val Tyr Thr Cys Gln Val
1 5 10

<210> 134
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 134

Pro Arg Ser Gly Glu Val Tyr Thr Cys Gln Val Glu His
1 5 10

<210> 135
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 135

Ser Gly Glu Val Tyr Thr Cys Gln Val Glu His Pro Ser

1 5 10

<210> 136

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 136

Glu Val Tyr Thr Cys Gln Val Glu His Pro Ser Val Thr

1 5 10

<210> 137

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 137

Tyr Thr Cys Gln Val Glu His Pro Ser Val Thr Ser Pro

1 5 10

<210> 138

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 138

Cys Gln Val Glu His Pro Ser Val Thr Ser Pro Leu Thr

1 5 10

<210> 139

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 139

Val Glu His Pro Ser Val Thr Ser Pro Leu Thr Val Glu

1 5 10

<210> 140

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 140
His Pro Ser Val Thr Ser Pro Leu Thr Val Glu Trp Arg
1 5 10

<210> 141
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 141
Ser Val Thr Ser Pro Leu Thr Val Glu Trp Arg Ala Arg
1 5 10

<210> 142
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 142

Thr Ser Pro Leu Thr Val Glu Trp Arg Ala Arg Ser Glu
1 5 10

<210> 143

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 143

Pro Leu Thr Val Glu Trp Arg Ala Arg Ser Glu Ser Ala
1 5 10

<210> 144

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 144

Thr Val Glu Trp Arg Ala Arg Ser Glu Ser Ala Gln Ser
1 5 10

<210> 145
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 145
Val Glu Trp Arg Ala Arg Ser Glu Ser Ala Gln Ser Lys
1 5 10

<210> 146
<211> 801
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 146
atggtgtgtc tgaagctccc tggaggctcc tgcatgacag cgctgacagt gacactgatg 60
gtgctgagct ccccactggc tttgtctggg gacacccgac cacgtttcct gtggcagcct 120
aagagggagt gtcatttctt caatgggacg gagcgggtgc ggttcctgga cagatacttc 180
tataaccagg aggagtccgt gcgcttcgac agcgacgtgg gggagttccg ggcggtgacg 240
gagctggggc ggcctgacgc tgagtactgg aacagccaga aggacatcct ggagcaggcg 300
cgggccgcgg tggacaccta ctgcagacac aactacgggg ttgtggagag cttcacagtg 360

cagcggcgag tccaacctaa ggtgactgta tatccttcaa agacccagcc cctgcagcac 420

cacaacctcc tggtctgctc tgtgagtggt ttctatccag gcagcattga agtcaggtgg 480

ttcctgaacg gccaggaaga gaaggctggg atggtgtcca caggcctgat ccagaatgga 540

gactggacct tccagaccct ggtgatgctg gaaacagttc ctcgaagtgg agaggtttac 600

acctgccaag tggagcaccc aagcgtgaca agccctctca cagtggaatg gagagcacgg 660

tctgaatctg cacagagcaa gatgctgagt ggagtcgggg gctttgtgct gggcctgctc 720

ttccttgggg ccgggctgtt catctacttc aggaatcaga aaggacactc tggacttcag 780

ccaacaggat tcctgagctg a 801

<210> 147

<211> 266

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 147

Met Val Cys Leu Lys Leu Pro Gly Gly Ser Cys Met Thr Ala Leu Thr
1 5 10 15

Val Thr Leu Met Val Leu Ser Ser Pro Leu Ala Leu Ser Gly Asp Thr
20 25 30

Arg Pro Arg Phe Leu Trp Gln Pro Lys Arg Glu Cys His Phe Phe Asn
35 40 45

Gly Thr Glu Arg Val Arg Phe Leu Asp Arg Tyr Phe Tyr Asn Gln Glu
50 55 60

Glu Ser Val Arg Phe Asp Ser Asp Val Gly Glu Phe Arg Ala Val Thr

65 70 75 80

Glu Leu Gly Arg Pro Asp Ala Glu Tyr Trp Asn Ser Gln Lys Asp Ile
85 90 95

Leu Glu Gln Ala Arg Ala Ala Val Asp Thr Tyr Cys Arg His Asn Tyr
100 105 110

Gly Val Val Glu Ser Phe Thr Val Gln Arg Arg Val Gln Pro Lys Val
115 120 125

Thr Val Tyr Pro Ser Lys Thr Gln Pro Leu Gln His His Asn Leu Leu
130 135 140

Val Cys Ser Val Ser Gly Phe Tyr Pro Gly Ser Ile Glu Val Arg Trp
145 150 155 160

Phe Leu Asn Gly Gln Glu Glu Lys Ala Gly Met Val Ser Thr Gly Leu
165 170 175

Ile Gln Asn Gly Asp Trp Thr Phe Gln Thr Leu Val Met Leu Glu Thr
180 185 190

Val Pro Arg Ser Gly Glu Val Tyr Thr Cys Gln Val Glu His Pro Ser
195 200 205

Val Thr Ser Pro Leu Thr Val Glu Trp Arg Ala Arg Ser Glu Ser Ala
210 215 220

Gln Ser Lys Met Leu Ser Gly Val Gly Gly Phe Val Leu Gly Leu Leu
225 230 235 240

Phe Leu Gly Ala Gly Leu Phe Ile Tyr Phe Arg Asn Gln Lys Gly His
245 250 255

Ser Gly Leu Gln Pro Thr Gly Phe Leu Ser
260 265

【図面の簡単な説明】

図１は、精製ヒト抗ＨＬＡ－ＤＲモノクローナル抗体のＭＬＲに対する免疫抑制活性を示す図である。

図２は、精製ヒト抗ＨＬＡ－ＤＲモノクローナル抗体の担ガンマウスモデルに対する延命効果を示す図である。図２Ａは投与用量１μｇ／ｈｅａｄの場合、図２Ｂは投与用量０．１μｇ／ｈｅａｄの場合の効果を示す図である。

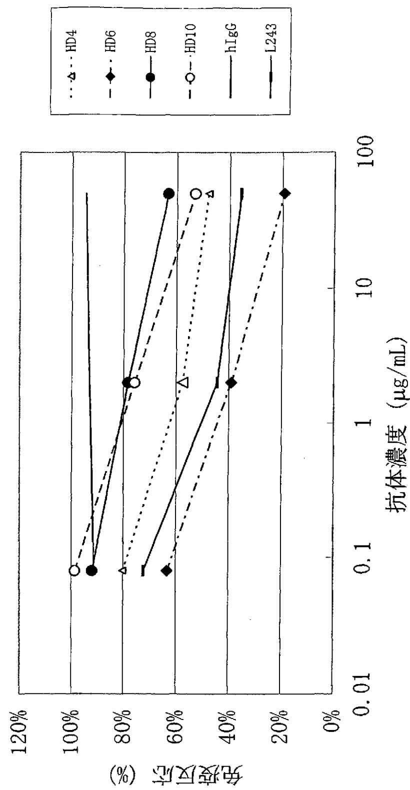
図３は、精製ヒト抗ＨＬＡ－ＤＲモノクローナル抗体の細胞依存性（ＡＤＣＣ）及び補体依存性（ＣＤＣ）の細胞傷害活性を示す図である。図３ＡはＨＤ８Ｇ１Ｓｅｒ及びＨＤ８Ｇ１のＡＤＣＣ活性を、図３ＢはＨＤ８Ｇ２ＣＨＯ、ＨＤ８Ｇ１、ＨＤ８Ｇ１Ｓｅｒ及びＨＤ８Ｇ４のＣＤＣ活性を、図３ＣはＨＤ８Ｇ１、ＨＤ８Ｇ２、ＨＤ８Ｇ２Ｓｅｒ、ＨＤ８Ｇ４、ＨＤ４Ｇ１、ＨＤ４Ｇ２Ｓｅｒ及びＨＤ４Ｇ４のＡＤＣＣ活性を、図３ＤはＨＤ８Ｇ１、ＨＤ８Ｇ２、ＨＤ８Ｇ２Ｓｅｒ、ＨＤ８Ｇ４、ＨＤ４Ｇ１、ＨＤ４Ｇ２Ｓｅｒ及びＨＤ４Ｇ４のＣＤＣ活性を示す。

図４は、マウス担癌モデルに対する本発明の抗体ＨＤ８Ｇ１Ｓｅｒ、ＨＤ８Ｇ２Ｓｅｒ及びＨＤ８Ｇ１の延命効果を示す図である。図４Ａは投与量０．１μｇ／匹の場合の結果、図４Ｂは投与量１．０μｇ／匹の場合の結果を示す図である。

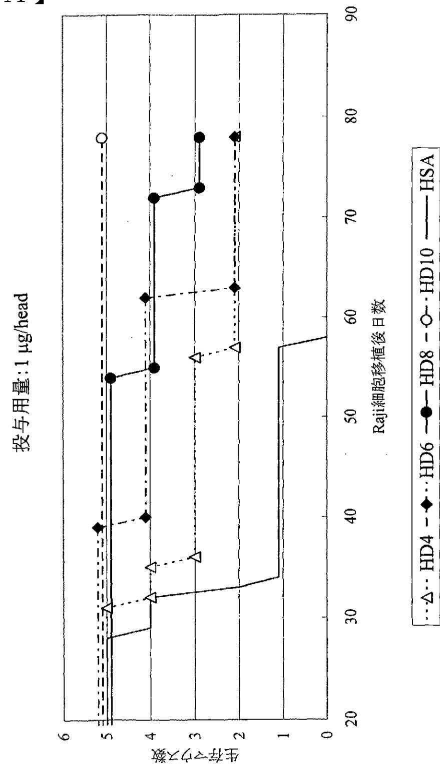
図５は、ＨＬＡ－ＤＲβ鎖配列の合成ペプチドを用いた精製ヒト抗ＨＬＡ－ＤＲモノクローナル抗体エピトープ解析を示す図である。図５Ａ、図５Ｂ及び図５Ｃは、それぞれＨＤ４、ＨＤ６及びＨＤ８についての解析を示す図である。

図６は、ＨＬＡ－ＤＲβ鎖エピトープ配列部分の多型配列の合成ペプチドを用いた精製ヒト抗ＨＬＡ－ＤＲモノクローナル抗体エピトープ解析を示す図である。

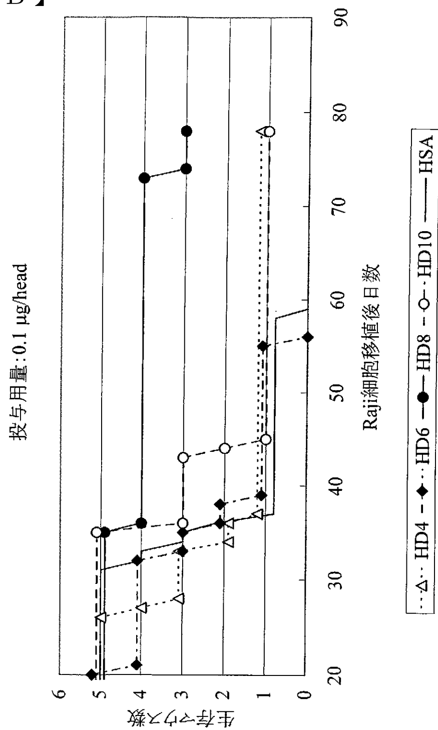
【図１】



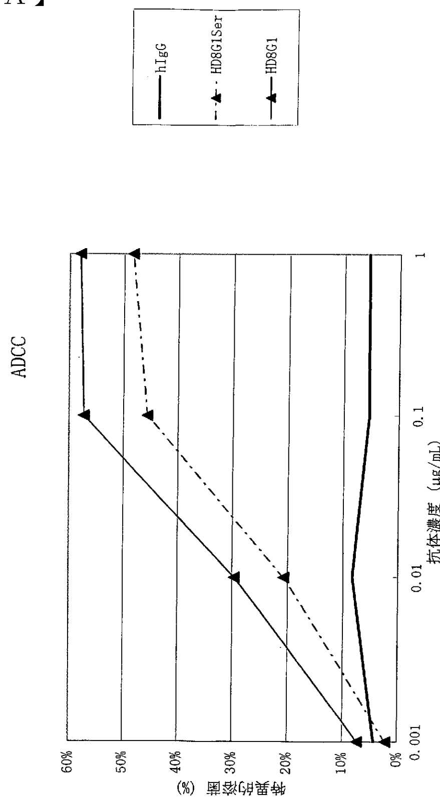

【図２Ａ】



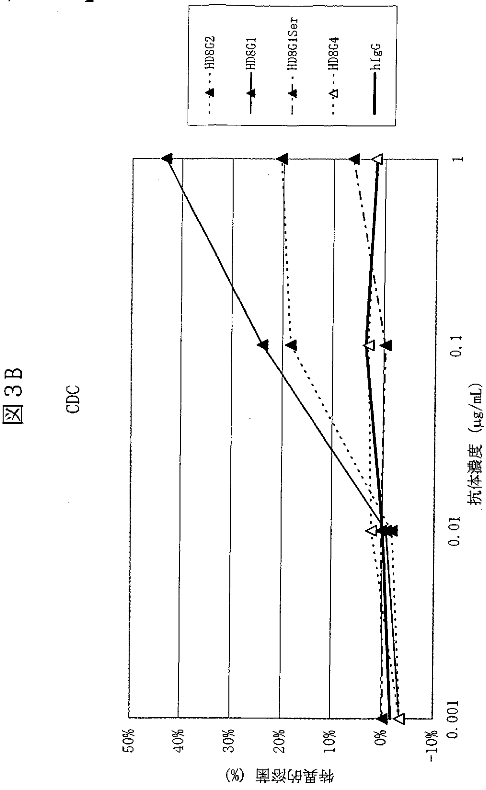

【図２Ｂ】



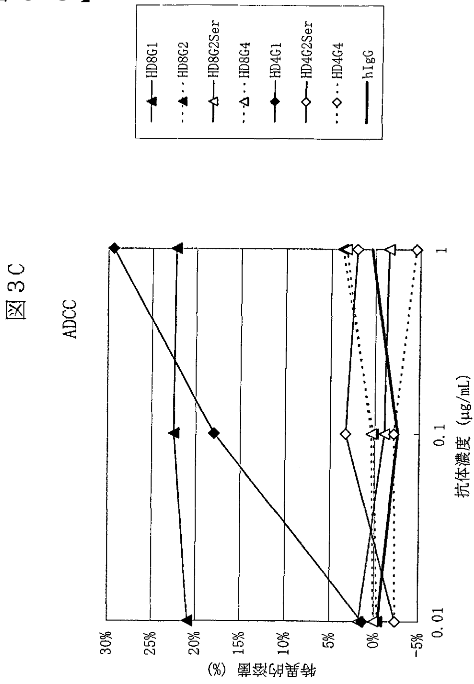

【図３Ａ】



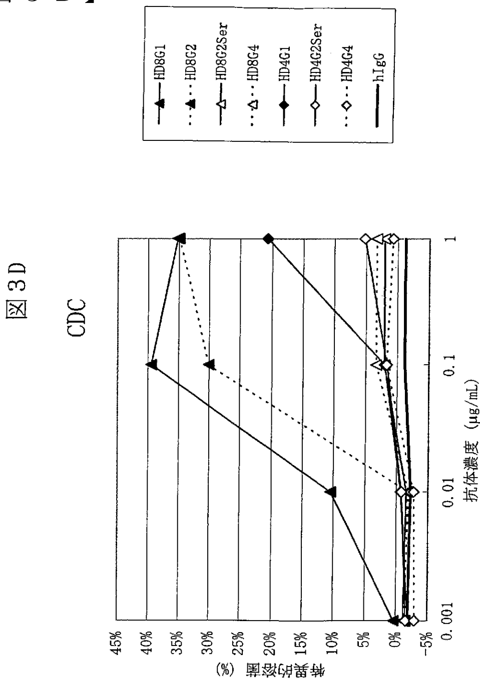
【図３Ｂ】



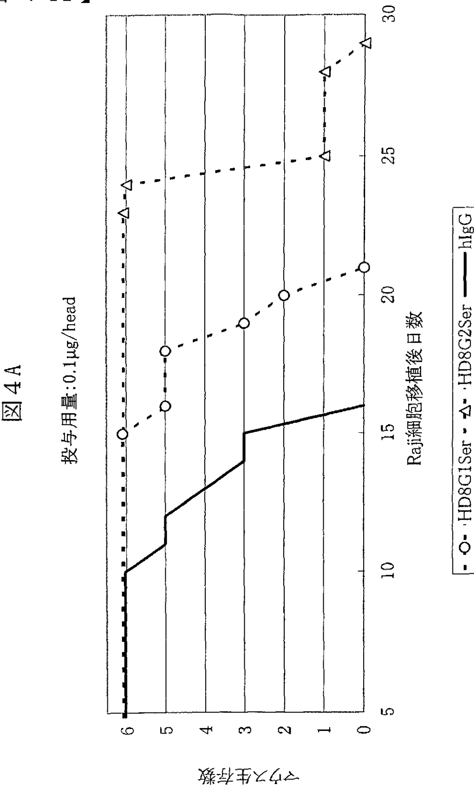

【図３Ｃ】



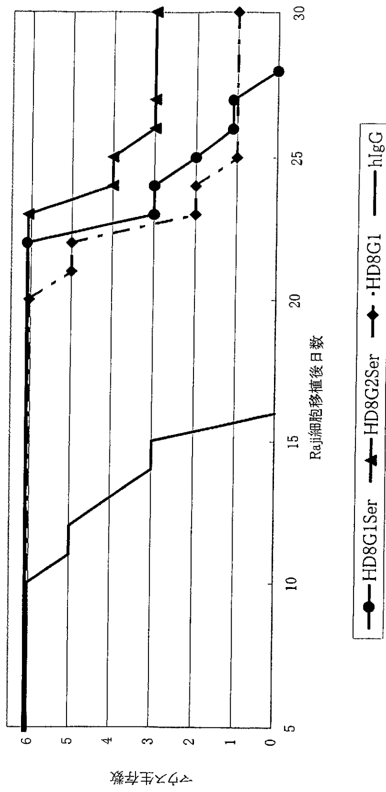

【図３Ｄ】



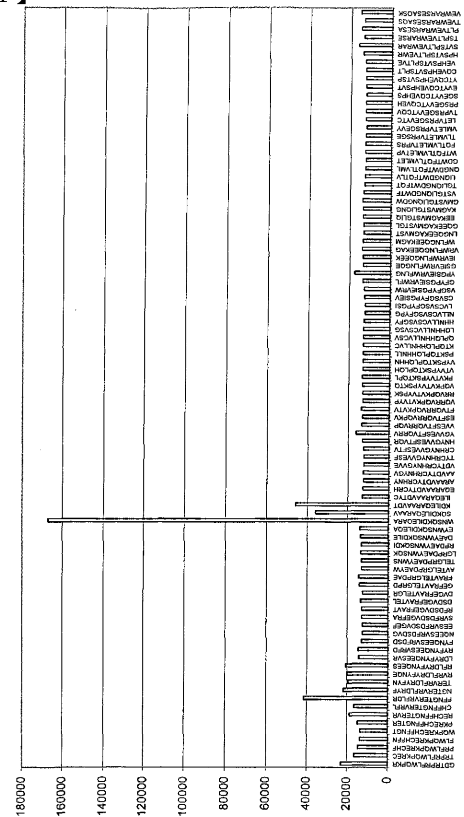

【図４Ａ】



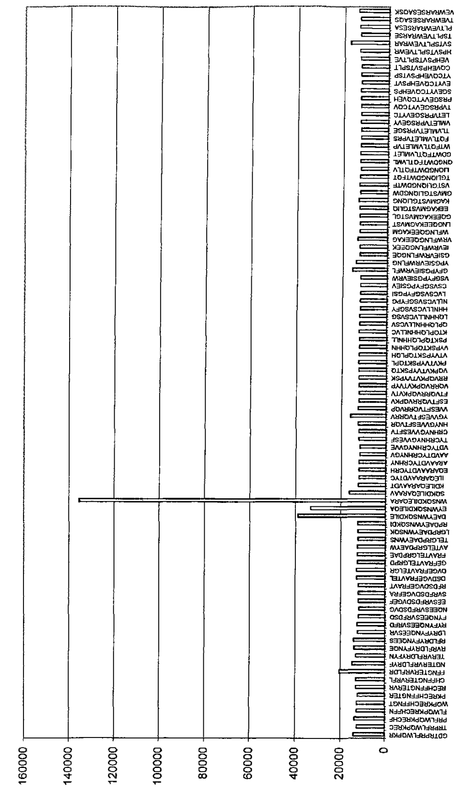
【図4B】



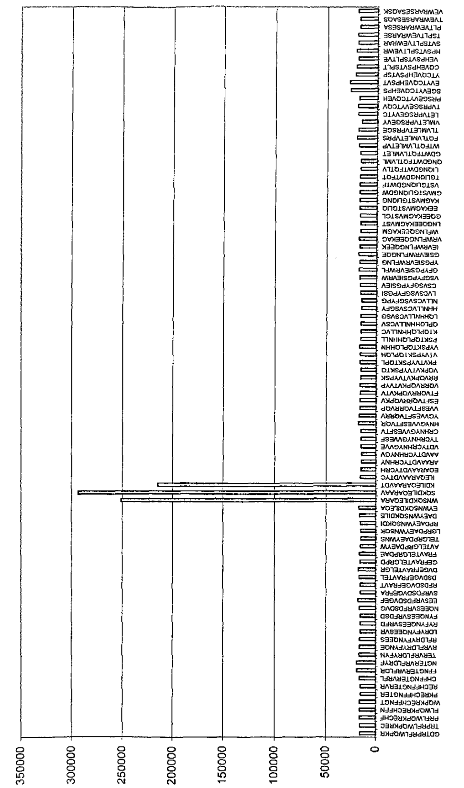

【図5A】




【図5B】




【図5C】



【図６】

図6

| 配列番号 | 61 | 62 | 63 | 64 | 65 | 66 | 67 | 68 | 69 | 70 | 71 | 72 | 73 | HD4 | HD6 | HD8 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 24 | W | N | S | Q | K | D | F | L | E | D | R | R | A | ++++ | +++ | +++ |
| 25 | W | N | S | Q | K | D | F | L | E | R | R | R | A | ++ | ++++ | ++++ |
| 26 | W | N | S | Q | K | D | F | L | E | D | E | R | A | ++++ | − | +++ |
| 27 | W | N | S | Q | K | D | F | L | E | Q | A | R | A | ++++ | ++ | ++++ |
| 28 | W | N | S | Q | K | D | I | L | E | D | E | R | A | +++ | − | ++++ |
| 29 | W | N | S | Q | K | D | I | L | E | Q | K | R | G | +/− | + | ++++ |
| 30 | W | N | S | Q | K | D | I | L | E | D | R | R | A | + | +/− | ++++ |
| 31 | W | N | S | Q | K | D | I | L | E | D | R | R | G | +/− | − | ++++ |
| 32 | W | N | S | Q | K | D | I | L | E | D | K | R | A | +/− | − | ++++ |
| 33 | W | N | S | Q | K | D | I | L | E | Q | A | R | A | +++ | +/− | ++++ |
| 34 | W | N | S | Q | K | D | L | L | E | Q | R | R | A | ++ | +++ | ++++ |
| 35 | W | N | S | Q | K | D | L | L | E | Q | A | R | A | ++++ | − | ++++ |
| 36 | W | N | S | Q | K | D | L | L | E | Q | K | R | G | + | + | +++ |
| 37 | W | N | S | Q | K | D | L | L | E | D | R | R | A | +++ | +/− | ++++ |
| 38 | W | N | S | Q | K | D | L | L | E | R | R | R | A | ++ | ++++ | ++++ |
| 39 | W | N | S | Q | K | D | L | L | E | D | E | R | A | +++ | − | +++ |
| 40 | W | N | S | Q | K | D | A | L | E | Q | R | R | A | + | +++ | ++++ |
| 41 | W | N | S | Q | K | D | L | L | E | A | R | R | A | ++++ | ++++ | ++++ |
| 42 | W | N | S | Q | K | D | L | L | E | Q | A | R | A | +++ | ++ | ++++ |
| 43 | W | N | S | Q | K | D | L | L | E | Q | R | R | G | + | +++ | +++ |
| 48 | W | N | S | Q | A | D | L | L | E | Q | R | R | A | − | +/− | +/− |
| 49 | W | N | S | Q | K | A | L | L | E | Q | R | R | A | − | ++ | +/− |
| 50 | W | N | S | Q | K | D | L | L | A | Q | R | R | A | − | ++ | − |
| 51 | W | N | S | Q | K | D | L | L | E | Q | R | A | A | − | +/− | − |
| 44 | A | N | S | Q | K | D | L | L | E | Q | R | R | A | +/− | +++ | ++++ |
| 45 | W | A | S | Q | K | D | L | L | E | Q | R | R | A | + | ++ | ++++ |
| 46 | W | N | A | Q | K | D | L | L | E | Q | R | R | A | + | ++ | ++++ |
| 47 | W | N | S | A | K | D | L | L | E | Q | R | R | A | + | ++ | ++++ |

【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP02/10665

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl$^7$ C07K16/28, C12N5/10, C12N15/13, C12N1/21, C12N1/19, C12P21/08, A61K39/395

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl$^7$ C07K16/28, C12N5/10, C12N15/13, C12N1/21, C12N1/19, C12P21/08, A61K39/395

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
REGISTRY(STN), CA(STN), MEDLINE(STN), WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| Y | KOSTELNY, S.A. et al., Humanization and characterization of the anti-HLA-DR antibody 1D10. Int. J. Cancer 2001. Aug, Vol.93, No.4, pages 556 to 565 | 1-93 |
| Y | NIMAN, H.L. et al., Generation of protein-reactive antibodies by short peptides is an event of high frequency: implications for the structural basis of immune recognition. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1983, Vol.80, No.16, pages 4949 to 4953 | 1-93 |
| Y | ULRICH, R.G. et al., Immune recognition of human major histocompatibility antigens: localization by a comprehensive synthetic strategy of the continuous antigenic sites in the first domain of HLA-DR2 β chain. Eur. J. Immunol. 1987, Vol.17, No.4, pages 497 to 502 | 1-93 |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

| Date of the actual completion of the international search | Date of mailing of the international search report |
|---|---|
| 16 January, 2003 (16.01.03) | 28 January, 2003 (28.01.03) |

| Name and mailing address of the ISA/ | Authorized officer |
|---|---|
| Japanese Patent Office | |
| Facsimile No. | Telephone No. |

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

国際調査報告　　国際出願番号 ＰＣＴ／ＪＰ０２／１０６６５

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int. Cl⁷ C07K 16/28, C12N 5/10, C12N 15/13, C12N 1/21, C12N 1/19, C12P 21/08, A61K 39/395

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int. Cl⁷ C07K 16/28, C12N 5/10, C12N 15/13, C12N 1/21, C12N 1/19, C12P 21/08, A61K 39/395

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

REGISTRY(STN), CA(STN), MEDLINE(STN), WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

Ｃ．　関連すると認められる文献

| 引用文献のカテゴリー＊ | 引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する請求の範囲の番号 |
|---|---|---|
| Y | KOSTELNY, S. A. et al. Humanization and characterization of the anti-HLA-DR antibody 1D10. Int. J. Cancer 2001. Aug, Vol. 93, No. 4, p. 556-565 | 1-93 |
| Y | NIMAN, H. L. et al. Generation of protein-reactive antibodies by short peptides is an event of high frequency: implications for the structural basis of immune recognition. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1983, Vol. 80, No. 16, p. 4949-4953 | 1-93 |

☒ Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。　　☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー

「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）

「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献

「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「＆」同一パテントファミリー文献

| | |
|---|---|
| 国際調査を完了した日　１６．０１．０３ | 国際調査報告の発送日　28.01.03 |
| 国際調査機関の名称及びあて先<br>日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）<br>郵便番号１００－８９１５<br>東京都千代田区霞が関三丁目４番３号 | 特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｂ　９２８１<br>高堀　栄二<br>電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４８ |

様式ＰＣＴ／ＩＳＡ／２１０（第２ページ）（１９９８年７月）

国際調査報告

国際出願番号 ＰＣＴ／ＪＰ０２／１０６６５

Ｃ（続き）．関連すると認められる文献

| 引用文献のカテゴリー＊ | 引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する請求の範囲の番号 |
|---|---|---|
| Y | ULRICH, R. G. et al. Immune recognition of human major histocompatibility antigens: localization by a comprehensive synthetic strategy of the continuous antigenic sites in the first domain of HLA-DR2 β chain. Eur. J. Immunol. 1987, Vol. 17, No. 4, p. 497-502 | 1-93 |

フロントページの続き

| (51)Int.Cl.⁷ | FI | |
|---|---|---|
| Ａ６１Ｐ　37/02 | Ａ６１Ｐ　37/02 | |
| Ａ６１Ｐ　37/06 | Ａ６１Ｐ　37/06 | |
| Ａ６１Ｐ　37/08 | Ａ６１Ｐ　37/08 | |
| Ｃ０７Ｋ　16/18 | Ｃ０７Ｋ　16/18 | |
| Ｃ１２Ｎ　1/15 | Ｃ１２Ｎ　1/15 | |
| Ｃ１２Ｎ　1/19 | Ｃ１２Ｎ　1/19 | |
| Ｃ１２Ｎ　1/21 | Ｃ１２Ｎ　1/21 | |
| Ｃ１２Ｎ　5/10 | Ｃ１２Ｐ　21/02 | Ｃ |
| Ｃ１２Ｐ　21/02 | Ｃ１２Ｐ　21/08 | |
| Ｃ１２Ｐ　21/08 | Ｃ１２Ｎ　5/00 | Ａ |
| | Ｃ１２Ｎ　5/00 | Ｂ |

（注）この公表は、国際事務局（ＷＩＰＯ）により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願（日本語実用新案登録出願）の国際公開の効果は、特許法第１８４条の１０第１項(実用新案法第４８条の１３第２項）により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。